

**(WO/2002/010361) \$g(a)-ISOMALTOSYLGLUCOSACCHARIDE SYNTHASE,  
PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF**

Biblio. Data Description Claims National Phase Notices Documents

## Latest bibliographic data on file with the International Bureau

Pub. No.: WO/2002/010361 International Application No.: PCT/JP2001/006412  
 Publication Date: 07.02.2002 International Filing Date: 25.07.2001

IPC: A21D 2/18 (2006.01), A23C 9/00 (2006.01), A23C 9/13 (2006.01), A23C 9/154 (2006.01), A23C 9/156 (2006.01), A23G 1/00 (2006.01), A23G 3/00 (2006.01), A23G 4/00 (2006.01), A23G 9/32 (2006.01), A23L 1/236 (2006.01), A23L 1/30 (2006.01), A23L 1/308 (2006.01), A23L 1/32 (2006.01), A23L 2/60 (2006.01), A61K 47/26 (2006.01), A61K 8/60 (2006.01), A61K 8/66 (2006.01), A61Q 11/00 (2006.01), A61Q 19/00 (2006.01), C07H 3/04 (2006.01), C07H 3/06 (2006.01), C12N 9/24 (2006.01)

Applicants: KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO [JP/JP]; 2-3, Shimoishii 1-chome Okayama-shi Okayama 700-0907 (JP) *(All Except US)*.  
 KUBOTA, Michio [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 TSUSAKI, Keiji [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 HIGASHIYAMA, Takanobu [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 FUKUDA, Shigeharu [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.  
 MIYAKE, Toshio [JP/JP]; (JP) *(US Only)*.

Inventors: KUBOTA, Michio; (JP).  
 TSUSAKI, Keiji; (JP).  
 HIGASHIYAMA, Takanobu; (JP).  
 FUKUDA, Shigeharu; (JP).  
 MIYAKE, Toshio; (JP).

Priority Data: 2000-233364 01.08.2000 JP  
 2000-234937 02.08.2000 JP

Title: \$g(a)-ISOMALTOSYLGLUCOSACCHARIDE SYNTHASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF

Abstract: \$g(a)-isomaltosylglucosaccharide synthase capable of transferring a-glucosyl from a saccharide, which carries an \$g(a)-glucosyl bond as the binding manner at the nonreducing end and has a degree of glucose polymerization of at least 2, without substantially elevating the reducing ability to thereby form a saccharide which carries an \$g(a)-1,6 glucosyl bond as the binding manner at the nonreducing end and an \$g(a)-1,4 glucosyl bond as a binding manner at other than the nonreducing end and has a degree of glucose polymerization of at least 3; cyclic tetrasaccharides obtained by using this enzyme; carbohydrates containing the same; and use thereof.

Designated States: AU, CA, CN, JP, KR, US.  
 European Patent Office (EPO) (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Publication Language: Japanese (JA)  
 Filing Language: Japanese (JA)

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 2 月 7 日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/10361 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/24, C12P 19/00, C07H 3/06,  
A23L 1/30, A61K 47/26, 7/00, 7/50, 7/16, 7/48

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06412

(22) 国際出願日: 2001 年 7 月 25 日 (25.07.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-233364 2000 年 8 月 1 日 (01.08.2000) JP  
特願2000-234937 2000 年 8 月 2 日 (02.08.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 久保田倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP]. 津崎桂二 (TSUSAKI, Keiji) [JP/JP]. 東山隆信 (HIGASHIYAMA, Takanobu) [JP/JP]. 福田恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]. 三宅俊雄 (MIYAKE, Toshio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社 林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title:  $\alpha$ -ISOMALTOSYLGLUCOSACCHARIDE SYNTHASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF

(54) 発明の名称:  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途

(57) Abstract:  $\alpha$ -Isomaltosylglucosaccharide synthase capable of transferring a-glucosyl from a saccharide, which carries an  $\alpha$ -glucosyl bond as the binding manner at the nonreducing end and has a degree of glucose polymerization of at least 2, without substantially elevating the reducing ability to thereby form a saccharide which carries an  $\alpha$ -1,6 glucosyl bond as the binding manner at the nonreducing end and an  $\alpha$ -1,4 glucosyl bond as a binding manner at other than the nonreducing end and has a degree of glucose polymerization of at least 3; cyclic tetrasaccharides obtained by using this enzyme; carbohydrates containing the same; and use thereof.

(57) 要約:

本発明は、非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく、 $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、及び、当該酵素を用いて得られる環状四糖またはこれを含む糖質及びそれらの用途を提供する。



WO 02/10361 A1

## 明 細 書

$\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途

## 5 技術分野

本発明は、新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、詳細には、新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とこの酵素を製造する方法、当該酵素を用いた  $\alpha$ -グルコシル転移方法、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、加えて、当該酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを併用したサイクロ {  
10  $\rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1  $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖の製造方法、並びにこれらの糖質を含有せしめた組成物に関する。

15

## 背景技術

グルコースを構成糖とする糖質、例えば、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物としては、アミロース、アミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などが知ら  
20 れている。これらの糖質は、通常、分子の両端が、それぞれ非還元末端と還元末端とからなり、還元性を示すことが知られている。一般に、澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント (D e x t r o s e E q u i v a l e n t = D E )  
25 として表わしている。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起し易く、褐変し悪

## 2

臭を発生して、品質を劣化し易い性質を有することが知られている。斯かる欠点を改善するために、澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減、若しくは消滅させる方法が古くから望まれていた。例えば、『ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society)』、第71巻、353乃至358頁(1949年)に開示されているように、澱粉にマセランス アミラーゼ (macerans amylase) を作用させることにより、6乃至8分子のグルコースが $\alpha$ -1, 4グルコシル結合した $\alpha$ -、 $\beta$ -または $\gamma$ -環状デキストリンを生成させる方法が知られている。現在では、澱粉からこれら環状デキストリンが工業的規模で生産され、これら環状デキストリンは、それらが有する、非還元性で、無味であり、包接能などの特性を生かした用途に利用されている。また、先に、本出願人が、特開平7-143876号公報、および特開平7-213283号公報などで開示したように、マルトオリゴ糖など澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させることにより、2分子のグルコースが $\alpha$ 、 $\alpha$ -結合したトレハロースを生成させる方法も知られている。現在では、澱粉からトレハロースが工業的規模で生産され、その非還元性で、温和で高品質な甘味特性などを生かした用途に利用されている。このように、グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、グルコース重合度が2の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、グルコース重合度が6乃至8の $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -環状デキストリンは、それぞれの特性を生かして工業的規模で生産、利用されているものの、その種類が限られており、更に多様な非還元性糖質乃至低還元性糖質の提供が望まれている。

一方、近年、グルコースを構成糖とする新たな環状の四糖類が報告



された。即ち、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第226巻、641乃至648 (1994年) には、主として、グルコース残基が $\alpha-1, 3$ 結合と $\alpha-1, 6$ 結合とが交互に連なっているアルテルナン (alternan) に加水分解酵素アルテルナナーゼ (alternanase) を作用させることによりサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖 (本明細書では特にことわらない限り、本糖質を「環状四糖」と略称することもある。) が生成し、これを有機溶媒の一種メタノール共存下で晶出させることが示されている。

環状四糖は、環状構造を有し、非還元性の糖質ゆえに、包接能を示し、揮発性有機物を安定化する作用やアミノカルボニル反応を起こさず、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待される。

しかしながら、環状四糖の製造に必要な原料のアルテルナンや酵素のアルテルナナーゼの入手が困難である上、それらを産生する微生物も入手できる状態にはない。

斯かる状況下、本発明者等は、先に特願2000-149484号明細書および特願2000-229557号明細書に開示したように、非還元末端の結合様式として、 $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質 (本明細書においては、本糖質を「 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質」と略称することもある。) を原料とし、これに、当該糖質の $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグル

コ糖質部分とを特異的に切断し、この $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移して環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生産することに成功した。この $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、 $\alpha$ -イソマルトグルコ糖質から $\alpha$ -イソマルトシル転移すること  
5 によって環状四糖を生成する酵素であって、下記に示す理化学的性質を有する酵素である。

(1) 作用

非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4 グルコシル結  
10 合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ { $\rightarrow$ 6} - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を生成する。

15 (2) 分子量

S D S-ゲル電気泳動法により、約82, 000ダルトン乃至約136, 000ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、p I 約3.7乃至  
20 約8.3の範囲内に等電点を有する。

(4) 至適温度

p H 6.0、30分間反応の条件下において、約45℃乃至約50℃の範囲内に至適温度を有する。

(5) 至適 p H

25 35℃、30分間反応の条件下において、p H 約5.5乃至約6.5の範囲内に至適 p Hを有する。

(6) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持する条件で、約45℃以下に安定温度域を有する。

(7) pH安定性

5           4℃、24時間保持する条件で、pH約3.6乃至約pH10.0の範囲内に安定pH域を有する。

しかしながら、環状四糖の原料糖質についてみると、豊富で安価に供給される澱粉からの生産が望まれるものの、実際には、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素が澱粉に直接作用しないことから、予め、澱粉を前述の特定構造を有する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質、例えば、パノ  
10           ースやイソマルトシルマルトースなどの比較的低分子のイソマルトオリゴ糖に変換させ、次いで、これに $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる手法が採用されている。

一方、原料からの環状四糖の生成率についてみると、パノースを用  
15           いる場合、原料パノース重量当たり約44%である。同様に、イソマルトシルマルトースを用いる場合、約31%であるのに対して、澱粉を用いる場合には、予め、 $\alpha$ -アミラーゼ、澱粉枝切り酵素、 $\beta$ -アミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼなどを作用させてパノースなどの比較的低分子のイソマルトオリゴ糖を生成させる必要があるだけでなく、環状四糖の生成率も約15%と極めて低いことが判明している。  
20

澱粉からの環状四糖の生産は、このように低い生成率でも実用可能であるものの、コスト高が懸念される。斯かる状況下、澱粉などの容易に入手できる材料を原料とする、環状四糖の生成率の高い新規な環状四糖の製造方法の確立が望まれる。

## 発明の開示

本願発明は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法、当該酵素を用いて得られる環状四糖またはこれを含む糖質、およびそれらの用途を提供することを課題とする。

- 5      本発明者等は、上記課題を解決するために、澱粉を原料とし、澱粉から環状四糖を高収率で得るために使用することできる新規な酵素に期待を込めて、斯かる酵素産生能を有する微生物を広く検索してきた。その結果、意外にも、先に特願 2 0 0 0 - 1 4 9 4 8 4 号および特願 2 0 0 0 - 2 2 9 5 5 7 号明細書で開示した、土壌から分離したバチ
- 10      ルス (B a c i l l u s) 属またはアルスロバクター属に属する微生物であって、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能を有する、バチルス
- グロビスポルス C 9 株、バチルス      グロビスポルス C 1 1 株、バチルス      グロビスポルス N 7 5 株、または、アルスロバクター      グロビホルミス A 1 9 株 (以下、それぞれ「微生物 C 9 株」、「微生物 C 1
- 15      1 株」、「微生物 N 7 5 株」、および「微生物 A 1 9 株」と言う。) が、本発明者等が目指していた新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能をも併せ持つことを見出した。澱粉部分分解物をはじめとする比較的高分子のグルコ糖質に、この新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させる
- 20      ことにより、本発明者等が目指していた環状四糖の生成率を著しく向上させることができる事実を新規に見出し、また、当該  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の諸性質を明らかにすると共に、その製造方法を確立し、更には、当該酵素による  $\alpha$ -グルコシル転移反応方法、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、および当該酵素と  $\alpha$ -イ
- 25      ソマルトシル転移酵素とを併用した環状四糖、またはこれを含む糖質およびその製造方法を確立して本発明を完成した。併せて、このよう

にして得られる環状四糖、または、これを含む糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して、本発明を完成した。

#### 図面の簡単な説明

5 第1図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた糖質を高速液体クロマトグラフィーにかけたときの溶出パターンを示す図である。

第2図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ -NMR スペクトル) を示す図である。

第3図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル) を示す図である。

15 第4図は、環状四糖の構造が、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) であることを示す図である。

20 第5図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第6図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

25 第7図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

第8図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソ

マルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

第 9 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 10 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルト  
5 シル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 11 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 12 図は、バチルス グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

10 第 13 図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 14 図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を  
15 示す図である。

第 15 図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

第 16 図は、本発明のバチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

20 第 17 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 18 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 19 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマル  
25 トシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 20 図は、バチルス グロビスポルス C 11 由来の  $\alpha$ -イソマル

トシル転移酵素の p H 安定性を示す図である。

第 2 1 図は、本発明のバチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

- 5 第 2 2 図は、本発明のバチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす p H の影響を示す図である。

第 2 3 図は、本発明のバチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

- 10 第 2 4 図は、本発明のバチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の p H 安定性を示す図である。

第 2 5 図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

- 15 第 2 6 図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす p H の影響を示す図である。

第 2 7 図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 2 8 図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素の p H 安定性を示す図である。

- 20 第 2 9 図は、本発明のアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

- 25 第 3 0 図は、本発明のアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす p H の影響を示す図である。

第 3 1 図は、本発明のアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由

来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

第 3 2 図は、本発明のアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の p H 安定性を示す図である。

第 3 3 図は、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 3 4 図は、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす p H の影響を示す図である。

第 3 5 図は、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 3 6 図は、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の p H 安定性を示す図である。

第 3 7 図は、アルスロバクター ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 3 8 図は、アルスロバクター ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす p H の影響を示す図である。

第 3 9 図は、アルスロバクター ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 4 0 図は、アルスロバクター ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の p H 安定性を示す図である。

第 4 1 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオースの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す図である。



第 4 2 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオースの  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示す図である。

第 4 3 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応  
5 により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオースの  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す図である。

第 4 4 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた  $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオースの  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す図である。

10 第 4 5 図は、本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶の顕微鏡写真をディスプレイ上に表示した中間調画像である。

第 4 6 図は、本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 4 7 図は、本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。  
15

第 4 8 図は、本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 4 9 図は、本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

20 第 5 0 図は、本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を  $40^\circ\text{C}$  で真空乾燥して得られる環状四糖無水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 5 1 図は、本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を  $120^\circ\text{C}$  で真空乾燥して得られる環状四糖無水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析  
25 したときの回折スペクトルを示す図である。

第 5 2 図は、本発明の無水環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱

重量曲線を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 以下、本発明の新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有する、微生物 C 9 株、C 1 1 株、N 7 5 株、および A 1 9 株の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、1 9 8 5 年）に準じて行った。

<微生物 C 9 株>

< A 細胞形態>

- 10 肉汁寒天培養、2 7 °C

通常 0 . 5 乃至 1 . 0 × 1 . 5 乃至 5  $\mu$  m の桿菌。多形性なし。運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。グラム陽性。

< B 培養性質>

- 15 (1) 肉汁寒天平板培養、2 7 °C

形状：円形 大きさは 2 日間で 1 乃至 2 m m。

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

- 20 表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

- (2) 肉汁寒天斜面培養、2 7 °C

生育：中程度

形状：放散状

- 25 (3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、2 7 °C

液化する。

## &lt; C 生理学的性質 &gt;

- (1) VP 試験：陰性
  - (2) インドールの生成：陰性
  - (3) 硝酸からのガス生成：陽性
  - 5 (4) 澱粉の加水分解：陽性
  - (5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない
  - (6) ウレアーゼ：陽性
  - (7) オキシダーゼ：陽性
  - (8) カタラーゼ：陽性
  - 10 (9) 生育の範囲：pH 5.5 乃至 9.0  
温度 10 乃至 35℃
  - (10) 酸素に対する態度：好気性
  - (11) 炭素源の利用性と酸生成の有無
- |    |         | 利用性  | 酸生成 |
|----|---------|------|-----|
| 15 | D-グルコース | 利用する | 陽性  |
|    | グリセロール  | 利用する | 陽性  |
|    | スクロース   | 利用する | 陽性  |
|    | ラクトース   | 利用する | 陽性  |
- (12) DNAのGC含量：40%
- 20 以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、第2巻(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、バチルス グロビスポルス (Bacillus globisporus)
- 25 本菌は、澱粉部分分解物から $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を生成す

る $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

これらの結果より本発明者等は、本菌をバチルス グロビスポルス  
5 (B a c i l l u s g l o b i s p o r u s) C 9 と命名し、平成  
12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央  
第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに  
寄託し、受託番号 F E R M B P - 7 1 4 3 とし受託された。

<微生物 C 1 1 >

10 < 0 0 1 8 >

< A 細胞形態 >

肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0×1.5乃至5 $\mu$ mの桿菌。多形性なし。運動性  
あり。球形の孢子を細胞内の端に形成。膨潤した孢子嚢を形成。グラ  
15 ム陽性。

< B 培養性質 >

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm。

周縁：全縁

20 隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

25 生育：中程度

形状：放散状

- (3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃  
液化する。

< C 生理学的性質 >

- (1) VP試験：陰性
- 5 (2) インドールの生成：陰性
- (3) 硝酸からのガス生成：陽性
- (4) 澱粉の加水分解：陽性
- (5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない
- (6) ウレアーゼ：陽性
- 10 (7) オキシダーゼ：陽性
- (8) カタラーゼ：陽性
- (9) 生育の範囲：pH 5.5乃至9.0  
温度10乃至35℃
- (10) 酸素に対する態度：好気性
- 15 (11) 炭素源の利用性と酸生成の有無
- |          | 利用性  | 酸生成 |
|----------|------|-----|
| D-グルコース  | 利用する | 陽性  |
| グリセロール   | 利用する | 陽性  |
| スクロース    | 利用する | 陽性  |
| 20 ラクトース | 利用する | 陽性  |
- (14) DNAのGC含量：39%

- 以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、
- 25 第2巻(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、バチルス グロビスポルス (Bacillus g

lobisporus) に属する微生物であることが判明した。また、  
本菌は、澱粉部分分解物から  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を生成す  
る  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から  $\alpha$ -イ  
ソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する  $\alpha$ -イソマルトシル転  
5 移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

これらの結果より本発明者等は、本菌をバチルス グロビスポルス  
(*Bacillus globisporus*) C11 と命名し、平  
成12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中  
央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター  
10 に寄託し、受託番号 FERM BP-7144 として受託された。

<微生物 N75>

<A 細胞形態>

肉汁寒天培養、27℃

通常 0.5 乃至 1.0 × 1.5 乃至 5 μm の桿菌。多形性なし  
15 。運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形  
成。グラム陽性

<B 培養性質>

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm。

20 周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

25 (2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状：放散状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

< C 生理学的性質 >

5 (1) VP 試験：陰性

(2) インドールの生成：陰性

(3) 硝酸からのガス生成：陽性

(4) 澱粉の加水分解：陽性

(5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない

10 (6) ウレアーゼ：陰性

(7) オキシダーゼ：陽性

(8) カタラーゼ：陽性

(9) 生育の範囲：pH 5.7 乃至 9.0

温度 10 乃至 35℃

15 (10) 酸素に対する態度：好気性

(11) 炭素源の利用性と酸生成の有無

		利用性	酸生成
	D-グルコース	利用する	陽性
	グリセロール	利用する	陽性
20	スクロース	利用する	陽性
	ラクトース	利用する	陽性

(12) DNAのGC含量：40%

以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、  
25 第2巻 (1986年) を参考にして、公知菌との異同を検討した。そ

の結果、本菌は、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、澱粉部分分解物から  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を生成する  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から  $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物バチルス グロビスポルス N 7 5 と命名し、平成 1 3 年 5 月 1 6 日付で、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 F E R M · B P - 7 5 9 1 として受託された。

<微生物 A 1 9 >

< A 細胞形態 >

(1) 肉汁寒天培養、2 7 °C

通常 0 . 4 乃至 0 . 8 × 1 . 0 乃至 4 . 0  $\mu$  m の桿菌。多形性あり。運動性なし。無孢子。グラム陽性。

(2) E Y G 寒天培地、2 7 °C

桿菌 - 球菌の生育サイクルを示す。

< B 培養性質 >

(1) 肉汁寒天平板培養、2 7 °C

形状：円形 大きさは 1 日間で 2 乃至 3 m m 。

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、黄色



(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状：糸状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

5 液化しない。

< C 生理学的性質 >

(1) 澱粉の加水分解：陰性

(2) 色素の生成：可溶性の色素の生成はない

(3) ウレアーゼ：陽性

10 (4) オキシダーゼ：陽性

(5) カタラーゼ：陽性

(6) 酸素に対する態度：好気性

(7) 細胞壁の主要ジアミノ酸：リジン

(8) 細胞壁のペプチドグリカン型：リジン - アラニン

15 (9) 細胞壁のN-アシル型：アセチル

(10) 細胞壁の構成糖：ガラクトース、グルコース、ラムノース、マンノース

(11) ビタミンの要求性：なし

(12) DNAのGC含量：62%

20 (13) DNA-DNAホモロジー：アルスロバクター グロビホルミス (ATCC 8010) との間で66.5%のDNA-DNAホモロジーを示す。

以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・  
25 システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、

第2巻（1986年）を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター グロビホルミス（*Arthrobacter globiformis*）に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、澱粉部分分解物から $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質を生成する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物アルスロバクター グロビホルミスA19と命名し、平成13年5月16日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託し、受託番号FERMBP-7590として受託された。

本発明に於いては、上記菌株のみに限定されることなく、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有する微生物である限り、バチルス属、アルスロバクター属、およびそれ以外の属に属する微生物はもとより、それら微生物の変異株も適宜用いることができる。尚、上記菌株以外の他の微生物をスクリーニングする方法は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の理化学的性質を指標として、公知の微生物スクリーニング方法を用いることにより、容易にスクリーニングすることができる。

また、本発明で用いることのできる $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質から $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素として、本発明者等が、岡山県岡山市の土壌から単離したアルスロバクター（*Arthrobacter*）属に属する微生物（以下、「微生物S1株」と言う。）由来の $\alpha$ -イソマルトシル

## 21

転移酵素も有利に用いることができる。この微生物 S 1 株の同定試験結果を下記に示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、1985年）に準じて行った。

< 微生物 S 1 株 >

5 < A 細胞形態 >

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.3乃至0.7  $\mu\text{m}$   $\times$  0.8乃至3.5  $\mu\text{m}$ の桿菌。多形性あり。運動性なし。無孢子。グラム陽性。

(2) E Y G 寒天培地、27℃

10 桿菌－球菌の生育サイクルを示す。

< B 培養性質 >

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形、大きさは1日間で2乃至3 mm

周縁：全縁

15 隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

20 生育：中程度

形状：糸状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化しない。

< C 生理学的性質 >

25 (1) 澱粉の加水分解：陰性

(2) 色素の生成：可溶性の色素の生成はない

- (3) ウレアーゼ：陽性
- (4) オキシダーゼ：陽性
- (5) カタラーゼ：陽性
- (6) 酸素に対する態度：好気性
- 5 (7) 細胞壁の主要ジアミノ酸：リジン
- (8) 細胞壁のペプチドグリカン型：リジン－アラニン
- (9) 細胞壁のN－アシル型：アセチル
- (10) 細胞壁の構成糖：ガラクトース、グルコース、ラムノース、マンノース
- 10 (11) ビタミンの要求性：なし
- (12) DNAのGC含量：65%
- (13) DNA－DNAホモロジー：アルスロバクター ラモサス (ATCC 13727) との間で84.4%のDNA－DNAホモロジーを示す。
- 15 以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、第2巻(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター ラモサス (Arthrobacter ramosus) に属する新規微生物であり、 $\alpha$ －イソマルトシルグルコ糖質から $\alpha$ －イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本発明に係る $\alpha$ －イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有する微生物であることが判明した。
- 20 以上の結果より、本発明者等は、本菌をアルスロバクター ラモサス S1 と命名し、平成13年5月16日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特

許生物寄託センターに寄託し、受託番号 F E R M B P - 7 5 9 2 と  
して受託された。

本発明に於いては、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能  
を有する微生物である限り、前記微生物 S 1 株の変異株も適宜用いる  
5 ことができる。尚、微生物 S 1 株の変異体をスクリーニングする方法  
は、本発明に係る  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の理化学的性質を指標  
として、公知の微生物スクリーニング方法を用いることにより、容易  
にスクリーニングすることができる。

本発明で用いる微生物の培養に用いる培地は、当該微生物が生育で  
10 き、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を産生し得る栄養培地で  
あればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源とし  
ては、当該微生物が生育に利用できるものであればよく、例えば、植  
物由来の澱粉やフィトグリコーゲン、動物や微生物由来のグリコーゲ  
ンやプルラン、また、これらの部分分解物やグルコース、フラクトー  
15 ス、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜な  
どの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸も使用することが  
できる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適  
宜選択される。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩な  
どの無機窒素化合物および、例えば、尿素、コーン・スティープ・リ  
20 カー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含  
有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、  
マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、  
亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられ  
る。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。  
25 培養は、通常、温度 4 乃至 40 °C、好ましくは 20 乃至 37 °C、p  
H 4 乃至 10、好ましくは 5 乃至 9 から選ばれる条件で好氣的に行わ

れる。培養時間は微生物が増殖し始める時間以上であればよく、好ましくは10時間乃至150時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましく、例えば、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、  
5 また、フエーメンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

このようにして微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、菌体を含め培養物全体に認められ、除菌液を粗酵素液として採取することも、培養物全体を  
10 粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものを遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。前述のように、菌体除去後の培養液は、粗酵素液として  
15 用いることもでき、一般的には、硫酸塩析法、アセトンおよびアルコール沈殿法、減圧濃縮、平膜、中空膜などの膜濃縮法により当該酵素を濃縮して利用する。

このようにして得られる、本発明の酵素を含む除菌液およびその濃縮液はそのまま、またはそれらの溶液中に含まれる当該酵素を公知の  
20 方法により固定化して用いることもできる。この際、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などとの共有結合法・吸着法、高分子物質を用いた包括法などを適宜採用できる。

前記酵素液中には、通常、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とが共存している。必要に応じて、公知の方法によって、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質  
25 生成酵素を分離・精製して、利用することもできる。一例として、培

養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー、さらに再度、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することにより、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を電気泳動的に単一な酵素として得ることができる。

本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の理化学的性質の特徴は、非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく  $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質を生成し、デキストラン生成能を有さず、EDTA によって活性が阻害される酵素であって、詳細には、下記の理化学的性質を有する。尚、前記非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質としては、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる 1 種または 2 種以上の糖質を例示できる。

#### (1) 作用

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質から、還元力を実質的に増加すること

なく  $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として  $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質を生成する

5 (2) 分子量

S D S-ゲル電気泳動法により、約 74,000 乃至 160,000 ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI 約 3.8 乃至 7.8 の  
10 範囲内に等電点を有する。

(4) 至適温度

pH 6.0、60 分間反応で、約 40 乃至 50 °C の範囲内に至適温度を有する。

pH 6.0、60 分間反応で、1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、約 45 乃至 5  
15 5 °C の範囲内に至適温度を有する。

pH 8.4、60 分間反応で、60 °C に至適温度を有する。または、  
pH 8.4、60 分間反応で 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、65 °C に至適温度を有する。

(5) 至適 pH

20 35 °C、60 分間反応で、pH 約 6.0 乃至 8.4 の範囲内に至適 pH を有する。

(6) 温度安定性

pH 6.0、60 分間保持する条件で、45 °C 以下に温度安定域を有する。

25 pH 6.0、60 分間保持する条件で、1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、約 50 °C 以下に温度安定域を有する。



pH 8.0、60分間保持する条件で、約55℃以下に温度安定域を有する。または、

pH 8.0、60分間保持する条件で、1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、約60℃以下に温度安定域を有する。

#### 5 (7) pH安定性

4℃、24時間保持する条件で、pH約4.5乃至10.0の範囲内に安定pH域を有する。

#### (8) N末端アミノ酸配列

チロシンーバリニンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパ  
10 ラギンーロイシンーイソロイシン、ヒスチジンーバリニンーセリンーアラニンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーロイシン、  
または、アラニンープロリンーロイシンーグリシンーバリニンーグルタ  
ミンーアルギニンーアラニンーグルタミンーフェニルアラニンーグル  
タミンーセリンーグリシン

15 本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質としては、  
澱粉、アミロペクチン、アミロース、グリコーゲンなどの $\alpha$ -1, 4  
グルコシル結合を含む多糖や、それらをアミラーゼまたは酸などによ  
って部分的に加水分解して得られるアミロデキストリン、マルトデキ  
ストリン、マルトオリゴ糖などの部分分解物が用いられる。これら $\alpha$ -  
20 -1, 4結合を含むグルコ糖質を、更にブランチングエンザイムなどの  
枝付け酵素 (EC 2.4.1.18) で処理した糖質を用いるこ  
とも随意である。アミラーゼで分解した部分分解物としては、例えば、  
『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エン  
ザイムズ (H a n d b o o k o f A m y l a s e s a n d R  
25 e l a t e d E n z y m e s)』、パーガモン・プレス社 (東京) (1988年) に記載されている、 $\alpha$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.

1) 、 $\beta$ -アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 2) 、マルトトリオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 116) 、マルトテトラオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 60) 、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 98) などのアミラーゼで分解した部分分解物を用いることができる。更には、部分分解物を調製する際、プルラナーゼ (3. 2. 1. 41) 、イソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) などの澱粉枝切り酵素を作用させることも随意である。

基質としての澱粉は、とうもろこし、小麦、米などの穀類に由来する地上澱粉であっても、また馬鈴薯、さつまいも、タピオカなどの地下澱粉であってもよく、好ましくは、澱粉を糊化および／または液化した溶液として用いられる。その澱粉の部分分解の程度は低い程、環状四糖の生成率が高くなることから、DE 約 20 以下、望ましくは約 12 以下、更に望ましくは約 5 以下が好適である。

本酵素の転移受容体としては、上記の基質自体が受容体となり得るばかりでなく、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、フコース、ソルボース、およびN-アセチルグルコサミンなどの単糖類、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、ラクトース、およびスクロースなどのオリゴ糖類、マルチトール、L-アスコルビン酸などを用いることができる。

基質濃度は特に限定されず、例えば、基質濃度 0. 1 % (以下、本明細書では、特に断らない限り、「w/w %」を単に「%」と略称する) の低濃度溶液として用いた場合でも、本発明の酵素反応は進行するが、工業的には、1 % 以上が好適である。また、基質溶液中に、完全に溶解しない不溶性基質を含有する形態の懸濁状溶液であっても

よい。望ましくは、濃度 40 % 以下、更に望ましくは 30 % 以下が好適である。

反応温度は反応が進行する温度、すなわち 65℃ 付近までの温度で行なえばよい。好ましくは 30 乃至 55℃ 付近の温度を用いる。反応  
5 pH は、通常、4.5 乃至 10 の範囲に調整すればよい。好ましくは pH 約 5.5 乃至 9 の範囲に調整する。反応時間は酵素反応の進行により適宜選択する。

本酵素の反応によって生成した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質に対して、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させることにより著量の環  
10 状四糖を製造することができる。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の作用は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させ、本酵素を失活させた後に行なってもよい。好ましくは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを併用して作用させる。例えば、澱粉またはその部分分解物やグリコーゲンの水  
15 溶液に本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを共存させ併用して作用させることにより、澱粉またはその部分分解物からは環状四糖が固形物当たり約 30 % 以上の高い生成率で、グリコーゲンの場合は約 80 % 以上もの高い生成率で環状四糖が得られる。この  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  
20  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との併用における環状四糖の生成メカニズムは、両酵素の反応特性から以下のように推察される。

(1) 本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質、例えば、澱粉、グリコーゲン、またはこれら  
25 の部分分解物などの糖質の非還元末端の  $\alpha$ -1, 4 グルコシル基に作用し、グルコース基を他の非還元末端グルコース基の 6 位水酸基に分

子間転移させ、非還元末端に $\alpha$ -イソマルトシル基を有する糖質が生成する。

(2)  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する糖質に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端に位置するイソマルトシル基を有する糖質の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質を生成する。

(3) 続いて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を前記糖質から切り離し、これを環状化して環状四糖を生成する。

(4) 切り離された糖質は、再度、(1)から(3)の反応を経由することによって、環状四糖を生成し、更にそれらの反応が繰返されて著量の環状四糖を蓄積する。

以上、説明したように、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との併用により、上記のように両酵素がそれらの基質に繰返し作用し、環状四糖の生成率が著しく向上するものと推察される。

また、この環状四糖生成反応の際、他の転移酵素を更に併用して、環状四糖の生成率を向上させることも有利に実施できる。即ち、例えば、濃度約15%の澱粉部分分解物に、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の二者を併用して作用させることにより、約55%の生成率で環状四糖が得られるところ、同じ条件で $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼの三者を併用して作用させることにより、環状四糖の最高生成率を、さ

らに約5乃至10%高めて約60乃至65%に向上させることができる。

また、環状四糖を生成させるに際し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能と、当該生成酵素で生成する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能とを有する微生物を用いる培養方法により環状四糖を製造方法することもできる。

斯かる微生物を用いる環状四糖を生成する方法において用いる培養培地は、非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含み、かつ当該微生物が生育し得る合成培地又は天然培地のいずれをも用いることができる。その他の培養条件は、前記した本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を産生させる条件を採用することができる。

上記の反応または培養によって得られた溶液は、環状四糖、またはこれを含む糖質を含む溶液としてこのまま用いることもできる。一般的には、これら糖質は精製して用いられる。精製方法としては、公知の方法を適宜採用すればよく、例えば、活性炭での脱色、H型、OH型イオン交換樹脂での脱塩、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、アミラーゼ、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 3) などや $\alpha$ -グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 20) などの酵素で残存している他の糖質の分解、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存して

いる還元性糖質の分解除去などの精製方法を1種または2種以上組み合わせて精製することができる。

とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーが好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、  
5 特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去することにより、目的物の含量を向上させた環状四糖、またはこれを含む糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

10 このようにして得られた環状四糖、またはこれを含む糖質を濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

環状四糖結晶を製造するには、例えば、有機溶媒存在下又は純度約50%以上、濃度約30%乃至90%の環状四糖高含有液を助晶缶にとり、環状四糖固形物当たり0.1乃至20%の種結晶共存下で、  
15 温度95℃以下、望ましくは10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、環状四糖結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットから環状四糖結晶またはこれを含む含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など  
20 公知の方法を採用すればよい。

このようにして製造される本発明の環状四糖は、上品で低甘味を有する非還元性の白色粉末で、安定な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変すること、異臭を発生することなく、混合した  
25 他の素材を損なうことも少ない。

また、本発明の環状四糖は、包接能を有していることから、香気成

分、有効成分などの揮散、品質劣化を防止し、香気成分、有効成分の安定化保持に極めて優れている。この際、必要ならば、シクロ（環状）デキストリン類、分岐シクロデキストリン類、シクロデキストラン類、シクロフラクタン類など他の環状糖質を併用することで、包接能  
5 による安定化を強化することも有利に実施できる。シクロデキストリン類などの環状糖質としては、高純度のものに限る必要はなく、低純度の環状糖質、例えば、多量のマルトデキストリンとともに各種のシクロデキストリンを含有した澱粉部分分解物なども有利に利用できる。

更に、本発明の環状四糖は、アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼによって分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、また、  
10 腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。粉末状物の付着、固結を防止することもできる。更に、本発明の環状四糖自体  
15 は、無毒、無害の天然甘味料であり、何らの危険性もなく、安定な甘味料であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤と糖衣錠として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の結晶防止性、難醗  
20 酵性などの性質を具備している。

従って、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

25 本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、そのまま甘味付のための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、

異性化糖、砂糖、麦芽糖、トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、ソーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用することも、又、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や $\alpha$ -グリコシルステビオシド、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。

また、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用することも随意である。

更に、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料への甘味料、更には、呈味改良剤、品質改良剤などとして使用することも有利に実施できる。



また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬け、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウに、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、品質改良などに有利に実施できる。また、和洋焼菓子の焼き立ての風味維持にも有利に使用できると共に、家畜、家禽、その他、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料など嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、

- 錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種の固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらに品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、
- 5 安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロナー $\alpha$ 、インターフェロナー $\beta$ 、インターフェロナー $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター（TNF） $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、
- 10 子、トランスファーファクター、インターロイキン I I などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エритроポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤
- 15 含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸または
- 20 そのエステル誘導体、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類またはローヤルゼリーなどの各種生理活性物質、更には、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペーストなどの有効成分や活性を失うことなく、安定で
- 25 高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などを容易

に製造できる。

上記で述べた、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質による、香気成分の揮散防止（保香）、活性成分の劣化防止、保湿、離水防止、他の糖質の晶出防止、蛋白質変性防止、脂質劣化防止、乳化状態の安定化などの効果や、それ自体の安定性・賦形性などは、当然のことながら、皮膚外用に通常利用される他の成分と配合した場合にも効果的に発揮される。そして、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質は、他の天然の糖質と同様に、皮膚に適用したときの刺激が極めて低く、かつ、皮膚における水分の保持にも奏功するので、当該糖質は、皮膚外用組成物に配合して利用することも有利に実施できる。斯かる皮膚外用組成物において、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質は、通常、皮膚への適用が許容される他の成分の1種又は2種以上、例えば、皮膚への外用が許容される、油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、エステル類、アルコール類、界面活性剤、色素、香料、ホルモン類、ビタミン類、植物エキス、動物エキス、微生物エキス、塩類、紫外線吸収剤、感光色素、抗酸化剤、防腐・殺菌剤、制汗・消臭剤、清涼剤、キレート剤、美白剤、消炎剤、酵素、糖質、アミノ酸類、増粘剤などから適宜選ばれる1種又は2種以上とともに配合される。当該皮膚外用組成物は、例えば、化粧品分野においては、ローション、クリーム、乳液、ゲル、粉末、ペースト、ブロックなどの形態で、石けん、化粧石けん、肌洗い粉、洗顔クリーム、洗顔フォーム、フェイシャルリンス、ボディーシャンプー、ボディーリンス、シャンプー、リンス、髪洗い粉などの清浄用化粧品、セットローション、ヘアブロー、チック、ヘアクリーム、ポマード、ヘアスプレー、ヘアリキッド、ヘアトニック、ヘアローション、養毛料、染毛料、頭皮用トリートメント、びん付油、つや出し油、髪油、スキ油などの頭髪化粧品、化粧水、バニシ

- ングクリーム、エモリエントクリーム、エモリエントローション、パック用化粧料（ゼリー状ピールオフタイプ、ゼリー状ふきとり型、ペースト状洗い流し型、粉末状など）、クレンジングクリーム、コールドクリーム、ハンドクリーム、ハンドローション、乳液、保湿液、アフターシェービングローション、シェービングローション、プレシェーブローション、アフターシェービングクリーム、アフターシェービングフォーム、プレシェーブクリーム、化粧用油、ベビーオイルなどの基礎化粧品、ファンデーション（液状、クリーム状、固型など）、タルカムパウダー、ベビーパウダー、ボディパウダー、パヒュームパウダー、メイクアップベース、おしろい（クリーム状、ペースト状、液状、固型、粉末など）、アイシャドウ、アイクリーム、マスカラ、眉墨、まつげ化粧料、頬紅、頬化粧水などのメイクアップ化粧品、香水、練香水、粉末香水、オーデコロン、パフュームコロン、オードトワレなどの芳香化粧品、日焼けクリーム、日焼けローション、日焼けオイル、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止めオイルなどの日焼け・日焼け止め化粧品、マニキュア、ペディキュア、ネイルカラー、ネイルラッカー、エナメルリムーバー、ネイルクリーム、爪化粧料などの爪化粧品、アイライナー化粧品、口紅、リップクリーム、練紅、リップグロスなどの口唇化粧品、練歯磨、マウスウォッシュなどの口腔化粧品、バスソルト、バスオイル、浴用化粧料などの入浴用化粧品などの用途に利用されるよう提供される。また、例えば、医薬品分野においては、当該皮膚外用組成物は、湿布剤、噴霧剤、塗布剤、浴剤、貼付剤、軟膏剤、パスタ剤、リニメント剤、ローション剤、パップ剤などの形態で提供される。
- 25 本発明の環状四糖又はこれを含む糖質とともに皮膚外用組成物に配合することができる他の成分を以下より具体的に述べると、油脂類と

しては、例えば、アボガド油、アーモンド油、オリーブ油、ゴマ油、サフラワー油、大豆油、ツバキ油、パーシック油、ヒマシ油、綿実油などの植物油（常温で液体）、カカオ脂、ヤシ脂、パーム油、モクロウなどの植物脂（常温で固体）、ミンク油、卵黄油、タートル油など

5 の動物油が挙げられる。

本発明で利用できるロウ類としては、例えば、ホホバ油、カルナウバロウ、キャンデリラロウなどの植物性ロウ、マッコウ鯨油、槌鯨油、ミツロウ、鯨ロウ、ラノリンなどの動物性ロウ、モンタンロウなどの鉱物性ロウが挙げられる。

10 本発明で利用できる炭化水素類としては、例えば、パラフィン（別名「固形パラフィン」）、流動パラフィン、セレシン、マイクロクリスタリンワックス、ワセリンなどの鉱物性炭化水素、スクワラン、スクワレンなどの動物起源の炭化水素が挙げられる。

本発明で利用できる脂肪酸類としては、例えば、ラウリン酸、ミリ  
15 スチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ベヘニン酸、ウンデシレン酸、ラノリン脂肪酸、硬質ラノリン脂肪酸、軟質ラノリン脂肪酸、イソステアリン酸ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できるアルコール類としては、例えば、ラウリルアル  
20 コール、セタノール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、ラノリンアルコール、水添ラノリンアルコール、ヘキシルデカノール、オクチルドデカノール、ポリエチレングリコールなどの高級アルコール（多価アルコールを含む）、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタ  
25 ノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの低級アルコール（多価アルコールを含む）ならびにこれらの化合

物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できるエステル類としては、例えば、ラウリン酸ヘキシル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸ミリスチル、ミリスチン酸セチル、ミリスチン酸オクチルドデシル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、ステアリン酸コレステリル、酢酸コレステリル、*n*-酪酸コレステリル、カプロン酸コレステリル、ラウリン酸コレステリル、ミリスチン酸コレステリル、パルミチン酸コレステリル、ステアリン酸コレステリル、1,2-ヒドロキシステアリン酸コレステリル、オレイン酸デシル、オレイン酸オクチルドデシル、ラノリン脂肪酸イソプロピル、トリミリスチン酸グリセリン、ジオレイン酸プロピレングリコール、乳酸ミリスチル、乳酸セチル、酢酸ラノリン、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシルならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる界面活性剤としては、例えば、ラウリン酸亜鉛、ミリスチン酸亜鉛、パルミチン酸亜鉛、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、セチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンセチルエーテルリン酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルリン酸、ラウロイルサルコシンナトリウム、ヤシ油脂肪酸サルコシントリエタノールアミン、ヤシ油脂肪酸メチルタウリンナトリウム、大豆リン脂質などの陰イオン性界面活性剤、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化セチルピリジニウム、臭化アルキルイソキノリニウム、ドデシルジメチル2-フェノキシエチルアンモニウムブロマイドなどの陽イオン性界面活性剤、 $\beta$ -ラウリル

- アミノプロピオン酸ナトリウム、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインなどの両イオン性界面活性剤、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン、親油型モノステアリン酸グリセリン、ジ
- 5 オレイン酸プロピレングリコール、モノラウリン酸ソルビタン、モノオレイン酸ソルビタン、ショ糖脂肪酸エステル、ウンデシレン酸モノエタノールアミド、ヤシ油ジエタノールアミド、モノオレイン酸ポリエチレングリコール、乳酸ミリスチル、乳酸セチル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、
- 10 モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビット、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの非イオン性界面活性剤や、
- 15 以上の化合物の誘導体が挙げられる。

- 本発明で利用できる色素としては、例えば、アマランス、エリスロシン、ローズベンガル、アシッドレッド、レーキレッドC、リソールレッド、ローダミン、ブリリアントレーキレッド、エオシンYS、ピオラミンR、ブリリアントファストスカーレット、ボンソーRなどの
- 20 赤色タール系色素、ジブロモフルオレセイン、パーマネントオレンジ、エリスロシン黄NA、オレンジIなどの橙色タール系色素、タートラジン、サンセットエロー、ウラニン、ベンチジンエローG、ナフトールエローS、エローABなどの黄色タール系色素、ファストグリーンFCF、アリザニンシアニンググリーンF、ライトグリーンSF黄、ナ
- 25 フトールグリーンBなどの緑色タール系色素、ブリリアントブルーFCF、インジゴカルミン、インジゴ、パテントブルーNA、カルバン

スレンブルー、スダンブルーなどの青色タール系色素、レゾルシンブラウンなどの褐色タール系色素、アリズリンパープル、アリズロールパープルなどの紫色タール系色素、ナフトールブルーブラックなどの黒色タール系色素、酸化亜鉛、酸化チタン、水酸化コバルト、水酸化アルミニウム、タルク、カオリン、雲母、ベントナイト、マンガンバイオレット、雲母チタンなどの無機顔料、 $\beta$ -カロチン、リコピン、クロシンなどのカロチノイド系色素、シソニン、サフロールイエロー、ルチン、ケルセチンなどのフラボノイド系色素、リボフラビンなどおフラビン系色素、コチニール、アリザニン、シコニンなどのキノン系色素や、以上の化合物の誘導体が挙げられる。

皮膚外用もしくは化粧品用に一般に利用される香料は、大別すると、天然香料である動物性香料及び植物性香料のほか、合成香料及びこれらを適宜配合した調合香料に分類される。本発明で利用できる動物性香料としては、例えば、じゃ香、霊猫香、海猫香、龍涎香などが挙げられる。植物性香料としては、例えば、アニスの実、バジルの葉、キャラウェイの果実、シナモンの樹皮、コリアンダーの種子、ラベンダーの花、ナツメグの種子、ペパーミントの葉、バラの花、ローズマリーの花種又は葉、タイムの葉などから水蒸気蒸留などによって得られる留出物（精油類）、ヒアシンスの花、ジャスミンの花、ミモザの花、バラの花、バニラの種子などから得られる抽出物（一般に、性状、製法によってアブソリュート類、レジノイド類、オレオレジン類、チンキ類に分類される）などが挙げられる。合成香料としては、例えば、アセトフェノン、アネソール、ベンジルアルコール、酢酸ブチル、カンフル、シトラール、シトロネロール、クミンアルデヒド、エストラゴール、エチルバニリン、酢酸ゲラニル、リナロール、メントール、メチル p-クレゾール、サリチル酸メチル、フェニル酢酸、バニリン



ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。また、本発明においては、以上のような香料を適宜配合した調合香料を利用することもできる。

- 本発明で利用できるホルモン類としては、例えば、エストロン、エストラジオールなどの卵胞ホルモン類、プロゲステロン、プレグノロンなどの黄体ホルモン類、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロンなどの副腎皮質ホルモン類が挙げられ、ビタミン類としては、例えば、レチノール、レチノイン酸、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、及び $\gamma$ -カロテン、これらの誘導体などのビタミンAに属する化合物、
- 5   チアミン（ビタミンB1）、リボフラビン（ビタミンB2）、ピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミン（以上ビタミンB6）、これらの誘導体などのビタミンBに属する化合物、L-アスコルビン酸や、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸をはじめとするグリコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビンもしくはグリコシル-L-アスコルビン酸のアシル化誘導体（別名「脂溶性ビタミンC」）、L-アスコルビン酸硫酸エステルなどその他のL-アスコルビン酸誘導体などのビタミンCに属する化合物、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール、これらの誘導体などのビタミンDに属する化合物、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、及び $\delta$ -トコフェロール、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、
- 10    $\gamma$ -、及び $\delta$ -トコトリエノール、これらの誘導体などのビタミンEに属する化合物が挙げられる。

- 本発明で利用できる植物抽出物としては、上記で述べた香料として利用される植物抽出物以外に、例えば、カミツレ抽出物、セージ抽出物、アロエ抽出物、サルビア抽出物、アシタバ抽出物、アボガド抽出物、イラクサ抽出物、ウイキョウ抽出物、ウーロン茶抽出物、オウバク抽出物、オオムギ抽出物、オクラ抽出物、オーリス抽出物、海藻抽
- 25

出物、カリン抽出物、カンゾウ抽出物、クインスシード抽出物、クチナシ抽出物、クマザサ抽出物、ケイヒ抽出物、紅茶抽出物、コメヌカ抽出物、コメヌカ発酵抽出物、ステビア抽出物、セロリ抽出物、センブリ抽出物、ダイズ抽出物、タイム抽出物、茶抽出物、ツバキ抽出物、  
5 トウキ抽出物、トウモロコシ抽出物、ニンジン抽出物、ハマナス抽出物、ヒノキ抽出物、ヘチマ抽出物、ベニバナ抽出物、マツ抽出物、モモ抽出物、ユーカリ抽出物、ユキノシタ抽出物、ユズ抽出物、ユリ抽出物、ヨクイニン抽出物、ヨモギ抽出物、藍藻抽出物、海藻抽出物、リンゴ抽出物、レイシ抽出物、レタス抽出物のほか、ヒノキチオール、  
10 アズレン、クロロフィル、グリチルリチンなどの植物からの単離化合物などが挙げられる。本発明で利用できる動物抽出物としては、例えば、胎盤抽出物が挙げられる。

本発明で利用できる微生物エキスとしては、例えば、酵母エキスが挙げられる。当該皮膚外用組成物において、塩類としては、皮膚外用  
15 が通常許容されている塩類が一般に利用できるほか、海水、海洋深層水、海水乾燥物、鉱泉塩などの天然塩（溶液を含む）も有利に利用できる。

本発明で利用できる紫外線吸収剤としては、例えば、パラアミノ安息香酸エチル、パラジメチルアミノ安息香酸エチルヘキシルエステル、  
20 シノキサート、パラメトキシ桂皮酸エチルヘキシルエステル、2-（2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル）ベンゾトリアゾール、オキシベンゾゾン、ウロカニン酸、ウロカニン酸エチルならびにこれらの化合物の誘導体のほか、5-クロロウラシル、グアニン、シトシンなどの紫外線遮蔽能を有する有機物質が挙げられ、感光色素としては、例  
25 えば、2, 2' [3' - [2 - (3-ヘプチル-4-メチル-2-チアゾリン-2-イリデン) エチリデン] プロペニレン] ビス [3-ヘ

プチル-4-メチル]チアゾリニウムヨードイド(別名「プラトニン」)、2-[2-(3-ヘプチル-4-メチル-2-チアゾリン-2-イリデン)メチン]-3-ヘプチル-4-メチルチアゾリニウムヨードイド(別名「ピオニン」)、6-[2-[(5-ブロモ-2-ピ  
 5 リジル)アミノ]ビニル]-1-エチル-2-ピコリニウムヨードイド(別名「タカナール」)、2-(2-アニリノビニル)-3,4-ジメチル-オキサゾリニウムヨードイド(別名「ルミネクス」)ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる抗酸化剤としては、既に述べた成分で抗酸化作用を有するものの他、例えば、没食子酸プロピル、没食子酸ブチル、没食子酸オクチル、没食子酸ドデシル、ノルジヒドロガイアレン酸(別名「NDGA」)、ブチルヒドロキシアニソール(別名「BHA」)、ジブチルヒドロキシトルエン(別名「BHT」)、4-ヒドロキシメチル1-2,6-ジターシャリーブチルフェノールならびにこれ  
 15 らの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる防腐・殺菌剤としては、既に述べた成分で防腐又は殺菌作用を有するモノの他、例えば、フェノール、パラクロロメタクレゾール、レゾルシン、パラオキシ安息香酸エステル、クレゾールなどのフェノール類、安息香酸、ソルビン酸、サリチル酸、ほう酸などの酸類(いずれも塩の形態を含む)、ヘキサクロロフェン、ビチ  
 20 オノール、ジクロロフェンなどのハロゲン化ビスフェノール類、3,4,4'-トリクロロカルバニリド、ウンデシレン酸モノエタノールアミドなどのアミド類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、  
 25 塩化デカリニウムなどの4級アンモニウム化合物の他、塩酸クロルヘキシジン、1-ヒドロキシピリジン-2-チオン、塩化リゾチーム

や、以上の化合物の誘導体が挙げられる。

- 本発明で利用できる制汗・消臭剤としては、塩化アルミニウム、塩化亜鉛、クロルヒドロキシアルミニウム、アラントインクロルヒドロキシアルミニウム、アラントインジヒドロキシアルミニウム、アルミニウムクロルヒドレート類などが挙げられ、清涼剤としては、例えば、
- 5   メントール、ハッカ油、ペパーミント油、カンフル、チモール、スピラントール、サリチル酸メチルなどが挙げられ、キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸誘導体、トリポリリン酸、ヘキサメタクリン酸、ジヒドロエチルグリシン、クエン酸、酒石酸、グルコン
- 10   酸、糖酸が挙げられる。

- 本発明で利用できる美白剤としては、既に述べた成分で美白作用を有するものの他、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、タイロシネース遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド）などの核酸、コウジ酸、乳酸、アントラニル酸、クマリン、ベンゾトリ
- 15   アゾール、イミダゾリン、ピリミジン、ジオキサン、フラン、ピロン、ニコチン酸、アルブチン、バイカリン、バイカレイン、及びベルベリン並びにこれらの化合物の誘導体、メラニン色素生成抑制剤、タイロシネース生成抑制剤、タイロシネース阻害剤が挙げられる。

- 本発明で利用できる消炎剤としては、既に述べた成分で消炎作用を示すものの他、アラントイン、アラントインアセチル-DL-メチオニン、アラントイン $\beta$ -グリチルレチン酸、イクタモール、インドメタシン、アセチルサリチル酸、塩酸ジフェンヒドラミン、グアイアズレン、カマズレン、マレイン酸クロルフェニラミン、グリチルリチン酸、グリチルレチン酸、シコン抽出物などが挙げられ、酵素として
- 20   は、枯草菌、放線菌、酵母などの微生物や、植物、動物に由来するプロテアーゼ、リパーゼ、リゾチームなどが挙げられる。
- 25

本発明で利用できる糖質としては、スクロース、マルトース、フラクトース、ラクトース、トレハロースなどの少糖類、シクロデキストリン類などの環状四糖以外の環状糖質類、マルチトール、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、アラビトールなどの糖アルコール

5 類、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、プルラン、セルロール、澱粉、デキストラン、ペクチン、カラギーナン、グアーガム、水飴、アラビアガム、トラガントガム、キサンタンガム、キチンなどの多糖類ならびにそれらの誘導体又は部分分解物が挙げられ、アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、シスチン、

10 ン、アスパラギン、グルタミン、ピロリドンカルボン酸、ヒドロキシプロリン、ピペコリン酸、サルコシン、ホモシステイン、ホモセリン、シトルリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システインスルフィン酸、アルギニノコハク酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、 $\beta$ -アラニン、タウリン、 $\beta$ -アミノ酪酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸や、以上の化合物の塩が挙げられる。

15

本発明で利用できる増粘剤としては、既述の成分で増粘作用を有するもののほか、例えば、クインスシード、アルギン酸ナトリウム、カチオン化セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチル澱粉、アルギン酸プロピレングリコール、コラーゲン、ケラチン、カゼイン、アルブミン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリドエーテル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン-ビニルアセテート共重合体、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルメチルエーテル、カルボキシビニルポリマーなど

20

25

の水溶性高分子、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウムなどの電解質のほか、各種の油分などが挙げられる。

なお、以上の例示においては、塩の形態をとりうる成分について、その塩の形態を全て例示しているわけではないけれども、皮膚外用剤が  
5 許容される塩であれば、例示された以外の塩であっても、本発明において適宜利用できることは言うまでもない。

以上述べたような各種組成物に、環状四糖、またはこれを含む糖質を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、  
10 塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

以下、本発明を実験を用いて詳細に説明する。

#### 15 実験1 培養物からの非還元性環状糖質の調製

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#1』、松谷化学株式会社製造）5w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグ  
20 ネシウム・7水塩0.05w/v%、および水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlを入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルスC9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養した後、遠心分離して菌体を除き培養上清を得た。  
25 さらに、その培養上清をオートクレーブ（120℃、15分間）し、放冷した後、不溶物を遠心分離して除き上清を回収した。

- 得られた上清中の糖質を調べるため、展開溶媒としてn-ブタノール、ピリジン、水混液（容量比6：4：1）、薄層プレートとしてメルク社製『キーゼルゲル60』（アルミプレート、20×20cm）を用い2回展開するシリカゲル薄層クロマトグラフィー（以下、「TLC」と略す。）を行ない、上清中の糖質を分離した。検出法として、分離した全糖質を硫酸-メタノール法で発色し、また、還元糖質をジフェニルアミン-アニリン法で発色して調べたところ、R<sub>f</sub>値が約0.31の位置に硫酸-メタノール法で陽性、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法で陰性の非還元性糖質が検出された。
- 10 先に得た上清約90mlをpH5.0、温度45℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物1グラム当たり1,500単位とグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物1グラム当たり75単位添加して24時間処理し、続いて、水酸化ナトリウム
- 15 でpHを12に調整し2時間煮沸して、残存する還元糖を分解した。不溶物を濾過して除去した後、三菱化学製イオン交換樹脂『ダイヤアイオンPK218』と『ダイヤイオンWA30』を用いて脱色、脱塩し、さらに、三菱化学製カチオン交換樹脂『ダイヤイオンSK-1B』とオルガノ製アニオン交換樹脂『IRA411』で再度脱塩し、活
- 20 性炭で脱色し、精密濾過した後、エバポレータで濃縮し凍結真空乾燥して固形物として約0.6gの糖質粉末を得た。

- 得られた糖質の組成を高速液体クロマトグラフィー法（以下、「HPLC」と略称する。）で調べたところ、第1図に示すように、溶出時間10.84分に単一ピークのみが検出され、純度は99.9%以上で極めて高純度であることが判明した。なお、HPLCは、『ショウデックス（Shodex）KS-801カラム』（昭和電工株式会
- 25

社製造) を用いカラム温度 60℃、流速 0.5 ml/min 水の条件で行い、検出は示唆屈折計『RI-8012』(東ソー株式会社製造) を用いて行なった。

また、還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、その還元力  
5 力は検出限界以下であり、本標品は実質的に非還元性糖質であると判断される。

## 実験 2 非還元性糖質の構造解析

実験 1 の方法で得られた非還元性糖質について、高速原子衝撃法による質量分析(通称「FAB-MS」)したところ、質量数 649 の  
10 プロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が 648 であることが判明した。

また、常法に従って、硫酸を用い加水分解し、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本  
15 糖質の構成糖は D-グルコースであることも判明し、質量数を考慮すると、本糖質は D-グルコース 4 分子からなる環状糖質であることがわかった。

さらに、本糖質を用いて核磁気共鳴法(通称、「NMR」)を行ったところ、第 2 図に示す<sup>1</sup>H-NMR スペクトルと、第 3 図に示す<sup>13</sup>C-NMR スペクトルが得られ、これらスペクトルを既知糖質のものと  
20 異同を比較したところ、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、641 乃至 648 頁(1994 年)に記載されている非還元性環状糖質サイクロ {→6}-α-D-グルコピラノ  
25 シルー (1→3)-α-D-グルコピラノシルー (1→6)-α-D-グルコピラノシルー (1→3)-α-D-グルコピラノシルー (1



→} のスペクトルと一致し、本糖質の構造が第 4 図に示す環状四糖、  
 即ち、サイクロ {→6) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - (1 → 3) -  
 $\alpha$  - D - グルコピラノシル - (1 → 6) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル  
 - (1 → 3) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - (1 →} であることが判  
 5 明した。

### 実験 3 バチルス グロビスポルス C 9 からの $\alpha$ - イソマルトシルグル ルコ糖質生成酵素の生産

澱粉部分分解物 (商品名『パインデックス # 4』、松谷化学株式会  
 10 社製造) 4. 0 w / v %、酵母抽出物 (商品名『アサヒミースト』、  
 (アサヒビール株式会社製造) 1. 8 w / v %、リン酸二カリウム 0.  
 1 w / v %、リン酸一ナトリウム・12 水塩 0. 06 w / v %、硫酸  
 マグネシウム・7 水塩 0. 05 w / v %、および水からなる液体培地  
 を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレー  
 15 ブで 121 °C、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポル  
 ス C 9 (FERM BP - 7143) を接種し、27 °C、230 rpm  
 m で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量 30 L のフエーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約 2  
 0 L 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27 °C とした後、種培養液 1 v  
 20 / v % を接種し、温度 27 °C、pH 6. 0 乃至 8. 0 に保ちつつ、4  
 8 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本発明の  $\alpha$  - イソ  
 マルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 0. 45 単位 / ml で、 $\alpha$  - イソ  
 マルトシル転移酵素活性は約 1. 5 単位 / ml で、環状四糖生成活性  
 は約 0. 95 単位 / ml であり、遠心分離 (10, 000 rpm、3  
 25 0 分間) して回収した上清約 18 L の酵素活性を測定したところ、本  
 発明の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約 0. 45 単位 / m

1の活性（総活性約8, 110単位）で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は約1.5単位/mlの活性（総活性約26, 900単位）で、環状四糖生成活性は約0.95単位/ml（総活性約17, 100単位）であった。

- 5      なお、酵素活性は次のようにして測定した。即ち、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度2w/v%となるよう100mM酢酸緩衝液（pH6.0）に溶解させて基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で60分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸
- 10      して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成するイソマルトシルマルトースとマルトースのうち、このマルトース量を、実験1に記載のHPLC法で定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 $\mu$ モルのマルトースを生成する酵素量とした。本明細書を通じて、 $\alpha$ -イ
- 15      ソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性は、以上のようにして測定される単位を意味する。

- また、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性の測定は、パノースを濃度2w/v%となるよう100mM酢酸緩衝液（pH6.0）に溶解させ基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で30分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反
- 20      応を停止させた後、その反応液中に主に生成する環状四糖とグルコースのうち、このグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することによって行った。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 $\mu$ モルのグルコースを生成する酵素量とし
- 25      た。本明細書を通じて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性は、以上のようにして測定される単位を意味する。

環状四糖生成活性の測定は、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス # 100』、松谷化学株式会社製造）を濃度 2 w / v % となるよう 50 mM 酢酸緩衝液（pH 6.0）に溶解させ基質液とし、その基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、35℃で60分間酵素反応し、その反応液を 100℃で10分間熱処理して反応を停止させた後、更に、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬製造）70 単位 / ml とグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）27 単位 / ml とを含む 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）1 ml を加えて、50℃で60分間処理し、その液を 100℃で10分間熱処理して酵素を失活させた後、環状四糖量を実験 1 に記載の HPLC 法で定量することによって行った。環状四糖生成活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1  $\mu$  モルの環状四糖を生成する酵素量とした。本明細書を通じて、環状四糖生成活性は、以上のようにして測定される活性（単位）を意味する。

15

#### 実験 4 バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の調製

##### 実験 4-1 バチルス グロビスポルス C9 由来酵素の精製

実験 3 で得られた培養上清約 18 L を 80 % 飽和硫酸液で塩析して 4℃、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000 rpm、30 分間）して回収し 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 400 ml を得た。この粗酵素液は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を 8,110 単位と、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を 24,700 単位と、環状四糖生成活性を約 15,600 単位有していた。この粗酵素液を三菱化学株式会社製『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィー（ゲ

25

ル容量 1, 000 ml) に供した。この際、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素および環状四糖のいずれも、『セパビーズ (Sepabeads) FP-D A13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不純物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース 0 mM から 100 mM のリニアグラジエントで溶出させたところ、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とは分離して溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約 0 M 付近に溶出し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 30 mM 付近に溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分と本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め回収した。また、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

以下、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソ

マルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 実験 4-2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

実験 4-1 で得た本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素  
 5 画分を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、  
 その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチル  
 ートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルを  
 用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵  
 素は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 6  
 10 50 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶  
 出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、  
 本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸  
 を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を  
 遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl)  
 15 HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー  
 を用いて精製した。この精製の各ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシ  
 ルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表 1 に示す。

表 1

工 程	$\alpha$ -イソマルトシルグル コ糖質生成酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシルグル コ糖質生成酵素比活性 (単位/mg 蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	8, 110	0.12	100
硫酸塩析後の透析液	7, 450	0.56	91.9
イオン交換カラム溶出液	5, 850	1.03	72.1
アフィニティークラム溶出液	4, 040	8.72	49.8
疎水カラム溶出液	3, 070	10.6	37.8
アフィニティークラム溶出液	1, 870	13.6	23.1

精製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5 w/v %濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

#### 実験4-3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

- 5 実験4-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分を、1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-ToyopEARL) 6
- 10 50 M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350 ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸1 Mから0 Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3 M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回
- 15 収液を1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表2に示す。

表 2

工 程	$\alpha$ -イソマルト シル転移酵素活 性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	26,900	0.41	100
硫酸塩析後の透析液	24,700	1.85	91.8
イオン交換カラム溶出液	19,400	3.41	72.1
アフィニティーカラム溶出液	13,400	18.6	49.8
疎水カラム溶出液	10,000	21.3	37.2
アフィニティーカラム溶出液	6,460	26.9	24.0

実験5  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

#### 5 実験5-1 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

実験4-2の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約140,000 $\pm$ 20,000ダルトンであった。

精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アンフォライン(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.2 $\pm$ 0.5であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、Ca<sup>2+</sup>非存在下と1mM存在下

で測定した。これらの結果を第5図（温度の影響）、第6図（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、60分間反応で約40℃（Ca<sup>2+</sup>非存在）、約45℃（Ca<sup>2+</sup> 1 mM存在）、至適pHは、35℃、60分間反応で約6.0乃至6.5であった。本酵素の

5 温度安定性は、酵素溶液（20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0）をCa<sup>2+</sup>非存在下または1 mM存在下で各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH 50 mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求め

10 た。それぞれの結果を第7図（温度安定性）、第8図（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約35℃まで（Ca<sup>2+</sup>非存在）、約40℃まで（Ca<sup>2+</sup> 1 mM存在）で、pH安定性は約4.5乃至9.0であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1 mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表3に示す。

15

表 3

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	4
Zn <sup>2+</sup>	92	Ba <sup>2+</sup>	65
Mg <sup>2+</sup>	100	Sr <sup>2+</sup>	80
Ca <sup>2+</sup>	115	Pb <sup>2+</sup>	103
Co <sup>2+</sup>	100	Fe <sup>2+</sup>	98
Cu <sup>2+</sup>	15	Fe <sup>3+</sup>	97
Ni <sup>2+</sup>	98	Mn <sup>2+</sup>	111
Al <sup>3+</sup>	99	EDTA	20

表3の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、



EDTAで著しく阻害され、 $Ba^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ で阻害された。 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ で活性化されることも判明した。

- 5 本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー モデル 473A（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列チロシンーバリニンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

#### 実験5-2 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

- 10 実験4-3の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約112,000 $\pm$ 20,000ダルトンであった。
- 15 精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.5 $\pm$ 0.5であった。
- 20 本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を第9図（温度の影響）、第10図（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約45℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより
- 25 求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4

℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第11図（温度安定性）、第12図（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃までで、pH安定性はpH約4.0乃至9.0であった。

- 5 本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表4に示す。

表 4

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	1
Zn <sup>2+</sup>	88	Ba <sup>2+</sup>	102
Mg <sup>2+</sup>	98	Sr <sup>2+</sup>	101
Ca <sup>2+</sup>	101	Pb <sup>2+</sup>	89
Co <sup>2+</sup>	103	Fe <sup>2+</sup>	96
Cu <sup>2+</sup>	57	Fe <sup>3+</sup>	105
Ni <sup>2+</sup>	102	Mn <sup>2+</sup>	106
Al <sup>3+</sup>	103	EDTA	104

- 10 表4の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>で阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

- 15 本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリニンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーアスパラギンーグリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

実験 6 バチルス グロビスポルス C 1 1 からの  $\alpha$ -イソマルトシル  
グルコ糖質生成酵素の生産

澱粉部分分解物『パインデックス # 4』 4. 0 w / v %、酵母抽出  
物『アサヒミースト』 1. 8 w / v %、リン酸二カリウム 0. 1 w /  
5 v %、リン酸一ナトリウム・12 水塩 0. 06 w / v %、硫酸マグネ  
シウム・7 水塩 0. 05 w / v %、および水からなる液体培地を、 5  
00 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 1  
21 °C、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C 1  
1 (FERM BP-7144) を接種し、27 °C、230 rpm で  
10 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量 30 L のフエーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約 2  
0 L 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27 °C とした後、種培養液 1 v  
/ v % を接種し、温度 27 °C、pH 6. 0 乃至 8. 0 に保ちつつ、4  
8 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約 0. 5  
15 5 単位 / ml で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約 1. 8 単位 /  
ml で、環状四糖生成活性は約 1. 1 単位 / ml であり、遠心分離 (  
10, 000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の酵素活  
性を測定したところ、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵  
素は約 0. 51 単位 / ml の活性 (総活性約 9、180 単位) で、 $\alpha$ -  
20 -イソマルトシル転移酵素は約 1. 7 単位 / ml の活性 (総活性約 3  
0, 400 単位) で、環状四糖生成活性は約 1. 1 単位 / ml (総活  
性約 19, 400 単位) であった。

実験 7 バチルス グロビスポルス C 1 1 由来酵素の調製

25 実験 7-1 バチルス グロビスポルス C 1 1 由来酵素の精製

実験 6 で得られた培養上清約 18 L を 80 % 飽和硫酸アンモニウムで塩析して

4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収し10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416mlを得た。この粗酵素液は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8,440単位、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を約28,000単位、環状四糖生成活性を約17,700単位を有することが判明した。この粗酵素液を、実験4-1に記載の『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性、環状四糖生成いずれも、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー（ゲル量500ml）に供した。酵素活性は、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース0mMから100mMのリニアグラジエントで溶出させたところ、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は分離して溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0.3M付近で溶出し、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約30mM付近で溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分と本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを別々に集

め回収した。実験4に記載のC9株の場合と同様に、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを混合した酵素液は環状四  
5 糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

以下、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソ  
10 マルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 実験7-2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠  
15 心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、  
20 硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。  
25 この精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

表 5

工 程	$\alpha$ -イソマルトシルグルコ 糖質生成酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシルグルコ 糖質生成酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	9, 180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8, 440	0.60	91.9
イオン交換カラム溶出液	6, 620	1.08	72.1
アフィニティークラム溶出液	4, 130	8.83	45.0
疎水カラム溶出液	3, 310	11.0	36.1
アフィニティークラム溶出液	2, 000	13.4	21.8

精製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

### 実験7-3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験7-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジェントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、

その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表6に示す。

5

表 6

工 程	$\alpha$ -イソマルト シル転移酵素活 性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	3 0, 4 0 0	0. 4 5	1 0 0
硫酸塩析後の透析液	2 8, 0 0 0	1. 9 8	9 2. 1
イオン交換カラム溶出液	2 1, 8 0 0	3. 5 6	7 1. 7
アフィニティークラム溶出液	1 3, 7 0 0	2 1. 9	4 5. 1
疎水カラム溶出液	1 0, 3 0 0	2 3. 4	3 3. 9
アフィニティークラム溶出液	5, 5 1 0	2 9. 6	1 8. 1

実験 8  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

#### 10 実験 8-1 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

実験 7-2 の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7.5 w/v %) に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 137,000 $\pm$ 20,000 ダルトンであった。

15 定したところ、分子量約 137,000 $\pm$ 20,000 ダルトンであった。

精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 2 w/v % アンフォライン (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) 含有等電

点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は pI 約 5.2 ± 0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、Ca<sup>2+</sup> 非存在下と 1 mM 存在下で測定した。これらの結果を第 13 図（温度の影響）、第 14 図（pH の影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、60 分間反応で約 45 °C（Ca<sup>2+</sup> 非存在）、約 50 °C（Ca<sup>2+</sup> 1 mM 存在）、至適 pH は、35 °C、60 分間反応で約 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0）を Ca<sup>2+</sup> 非存在下または 1 mM 存在下で各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4 °C、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第 15 図（温度安定性）、第 16 図（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 40 °C まで（Ca<sup>2+</sup> 非存在）、約 45 °C まで（Ca<sup>2+</sup> 1 mM 存在）で、pH 安定性は約 5.0 乃至 10.0 であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 7 に示す。



表 7

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	4
Zn <sup>2+</sup>	91	Ba <sup>2+</sup>	65
Mg <sup>2+</sup>	98	Sr <sup>2+</sup>	83
Ca <sup>2+</sup>	109	Pb <sup>2+</sup>	101
Co <sup>2+</sup>	96	Fe <sup>2+</sup>	100
Cu <sup>2+</sup>	23	Fe <sup>3+</sup>	102
Ni <sup>2+</sup>	93	Mn <sup>2+</sup>	142
Al <sup>3+</sup>	100	EDTA	24

表 7 の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、EDTA で著しく阻害され、Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup> で阻害された。Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> で活性化されることも判明した。

本酵素の N 末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列 N 末端チロシンーバリニンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンの N 末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

この N 末端アミノ酸配列結果を実験 5-1 のバチルス グロビスポルス C9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の N 末端配列と比較すると同一であることが判明し、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の共通する N 末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 1 に示すアミノ酸配列チロシンーバリニンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンの N 末端アミノ酸配列であることが判明した。

## 20 実験 8-2 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験 7-3 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w/v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 102,000  $\pm$  20,000 ダルトンであった。

精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を 2 w/v % アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は pI 約 5.6  $\pm$  0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を第 17 図（温度の影響）、第 18 図（pH の影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、30 分間反応で約 50  $^{\circ}$ C、至適 pH は、35  $^{\circ}$ C、30 分間反応で約 5.5 乃至 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0）を各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4  $^{\circ}$ C、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第 19 図（温度安定性）、第 20 図（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 40  $^{\circ}$ C までで、pH 安定性は約 4.5 乃至 9.0 であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 8 に示す。

表 8

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	2
Zn <sup>2+</sup>	83	Ba <sup>2+</sup>	90
Mg <sup>2+</sup>	91	Sr <sup>2+</sup>	93
Ca <sup>2+</sup>	91	Pb <sup>2+</sup>	74
Co <sup>2+</sup>	89	Fe <sup>2+</sup>	104
Cu <sup>2+</sup>	56	Fe <sup>3+</sup>	88
Ni <sup>2+</sup>	89	Mn <sup>2+</sup>	93
Al <sup>3+</sup>	89	EDTA	98

- 表 8 の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>で阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されないことも、
- 5 EDTAで阻害されないこともわかった。

- 本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 3 に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリニンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。このN末端アミノ酸配列結果を実験 5-2 のバチルス グロビスポルス C9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のN末端配列と比較して、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 4 に示すアミノ酸配列の
- 10 イソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリニンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。
- 15

実験 9  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および  $\alpha$ -イソマル

## トシル転移酵素のアミノ酸配列

実験 9-1  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 7-2 の方法で得られた精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 mg/ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 10  $\mu$ g のトリプシン (和光純薬株式会社販売) を加え、30  $^{\circ}$ C、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行なった。マイクロボンドパック C18 カラム (直径 2.1 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で 0.1% トリフルオロ酢酸-8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸-40% アセトニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P64 (保持時間約 64 分)、P88 (保持時間約 88 分)、P99 (保持時間約 99 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200  $\mu$ l の 0.1% トリフルオロ酢酸-50% アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 5 乃至 7 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 9 に示す。

表 9

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P 6 4	アスパラギン酸-アラニン-セリン-アラニン-アスパラギン-バリン-スレオニン-スレオニン
P 8 8	トリプトファン-セリン-ロイシン-グリシン-フェニルアラニン-メチオニン-アスパラギン-フェニルアラニン
P 9 9	アスパラギン-チロシン-スレオニン-アスパラギン酸-アラニン-トリプトファン-メチオニン-フェニルアラニン

### 実験 9 - 2 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 7 - 3 の方法で得られた精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品

5 の一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 mg/ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 10  $\mu$ g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30°C、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行

10 なった。マイクロボンドパック C18 カラム (直径 2.1 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速 0.9 ml/分、室温で、0.1% トリフルオロ酢酸-8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸-40% アセトニトリル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長

15 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P 2 2 (保持時間約 22 分)、P 6 3 (保持時間約 63 分)、P 7 1 (保持時間約 71 分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200  $\mu$ l の 0.1% トリフルオロ酢酸-50% アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテイン

20 シーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したと

ころ、配列表における配列番号 8 乃至 10 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 10 に示す。

表 10

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P 2 2	グリシン-アスパラギン-グルタミン酸-メチオニン-アルギニン-アスパラギン-グルタミン-チロシン
P 6 3	イソロイシン-スレオニン-スレオニン-トリプトファン-プロリン-イソロイシン-グルタミン酸-セリン
P 7 1	トリプトファン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-トリプトファン-メチオニン-セリン

5

実験 10 バチルス グロビスポルス N 7 5 からの  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産

- 澱粉部分分解物『パインデックス # 4』4.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v %、リン酸二カリウム 0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム・12 水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05 w/v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス N 7 5 (FERM BP-7591) を接種し、27 °C、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

- 容量 30 L のファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌し、冷却して、温度 27 °C とした後、種培養液 1 v/v % を接種し、温度 27 °C、pH 6.0 乃至 8.0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約 0.34 単位/ml で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約 1.1 単位/ml で、環状四糖生成活性は約 0.69 単位/ml であり、遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の酵

20

素活性を測定したところ、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0.33単位/mlの活性（総活性約5,940単位）で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は約1.1単位/mlの活性（総活性約19,800単位）で、環状四糖生成活性は約0.67単位/ml（  
5 総活性約12,100単位）であった。

#### 実験11 バチルス グロビスポルスN75由来の酵素の調製

##### 実験11-1 バチルス グロビスポルスN75由来酵素の精製

実験10で得られた培養上清約18Lを60%飽和硫酸液で塩析し  
10 て4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収し10mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.3）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約450mlを得た。この粗酵素液は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を4,710単位、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を  
15 約15,700単位、環状四糖生成活性を約9,590単位を有することが判明した。この粗酵素液を、実験4-1に記載の『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA1  
20 3』ゲルに吸着し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。続いて、NaCl濃度0Mから1Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、NaClのリニアグラジエントでその濃度が約0.  
25 25M付近で溶出した。そこで、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分と本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを別々に

集め回収した。実験 4 に記載の C 9 株の場合および実験 7 に記載の C 1 1 株の場合と同様に、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分と  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

以下、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 実験 1 1 - 2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を 1 M 硫酸を含む 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 5 0 0 m l) に供した。酵素活性は、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース 0 m M から 1 0 0 m M のリニアグラジエントで溶出させたところ、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 3 0 m M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。この回収液を 1 M 硫酸を含む 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (B u t y l - T o



- y o p e a r l) 6 5 0 M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー（ゲル量 3 5 0 m l）に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール（B u t y l - T o y o p e a r l) 6 5 0 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0 . 3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 1 0 m M リン酸緩衝液（p H 7 . 0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（S e p h a c r y l）H R S - 2 0 0』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各
- 10 ステップにおける  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表 1 1 に示す。

表 1 1

工 程	$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素比活性 (単位/mg 蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	5, 9 4 0	0. 1 0	1 0 0
硫酸塩析後の透析液	4, 7 1 0	0. 1 9	7 9. 3
イオン交換カラム 溶出液	3, 2 0 0	2. 1 2	5 3. 9
アフィニティークラム 溶出液	2, 2 1 0	7. 5 5	3 7. 2
疎水カラム溶出液	1, 7 2 0	1 0. 1	2 9. 0
アフィニティークラム 溶出液	1, 3 2 0	1 2. 5	2 2. 2

- 15 精製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 7. 5 w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純

度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

### 実験 1 1 - 3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 1 1 - 1 に記載のイオン交換クロマトグラフィーによって  $\alpha$ -  
5 イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した  $\alpha$ -イソマルトシ  
ル転移酵素画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.  
0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム  
・ファルマシア・バイオテク株式会社製『Sephacryl HR  
S-200』ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー  
10 (ゲル量 500 ml) に供した。本酵素は、『Sephacryl HR  
S-200』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエン  
トで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶  
出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。さらに、酵素画分を 1  
M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透  
15 析液を遠心分離して不溶物を除き、『Butyl-Toyopearl  
650 M』ゲルを用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量  
380 ml) に供した。本酵素は、『Butyl-Toyopearl  
650 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエン  
トで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶  
20 出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。この回収液を 10 mM  
トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に透析し、その透析液を遠心分離し  
て不溶物を除き、東ソー株式会社製『Super Q-Toyopearl  
650 C』ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー  
(ゲル量 380 ml) に供した。本酵素は、『Super Q-Toy  
25 opearl 650 C』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出し、  
得られた溶出画分を回収し、最終精製酵素標品とした。この精製の各

ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表12に示す。

表12

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培 養 上 清	19,000	0.33	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.64	82.6
イオン交換カラム溶出液	12,400	3.56	65.3
アフィニティーカラム溶出液	8,320	11.7	43.8
疎水カラム溶出液	4,830	15.2	25.4
イオン交換カラム溶出液	3,850	22.6	20.3

5

精製した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を7.5%w/v濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

## 10 実験12 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

### 実験12-1 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

実験11-2の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.

15 5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・

ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約136,000±20,000ダルトンであった。

- 精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アン  
5 フォライン(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約7.3±0.5であった。

- 本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調  
10 べた。なお、温度の影響については、 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下と1mM存在下で測定した。これらの結果を第21図(温度の影響)、第22図(pHの影響)を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、60分間反応で約50℃( $\text{Ca}^{2+}$ 非存在)、約55℃( $\text{Ca}^{2+}$ 1mM存在)、至適pHは、35℃、60分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安  
15 定性は、酵素溶液(20mM酢酸緩衝液、pH6.0)を $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下または1mM存在下で各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。  
20 それぞれの結果を第23図(温度安定性)、第24図(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は約45℃まで( $\text{Ca}^{2+}$ 非存在)、約50℃まで( $\text{Ca}^{2+}$ 1mM存在)で、pH安定性は約5.0乃至9.0であった。

- 本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存  
25 在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表13に示す。

表 1 3

金 属 イ オ ン	相 対 活 性 (%)	金 属 イ オ ン	相 対 活 性 (%)
無 添 加	1 0 0	H g <sup>2+</sup>	1
Z n <sup>2+</sup>	8 2	B a <sup>2+</sup>	8 4
M g <sup>2+</sup>	9 6	S r <sup>2+</sup>	8 5
C a <sup>2+</sup>	1 0 8	P b <sup>2+</sup>	8 6
C o <sup>2+</sup>	9 3	F e <sup>2+</sup>	8 2
C u <sup>2+</sup>	7	F e <sup>3+</sup>	9 3
N i <sup>2+</sup>	9 3	M n <sup>2+</sup>	1 2 0
A l <sup>3+</sup>	9 8	E D T A	3 5

表 1 3 の結果から明らかなように、本酵素活性は、H g <sup>2+</sup>、C u <sup>2+</sup>、E D T A で著しく阻害された。C a <sup>2+</sup>、M n <sup>2+</sup> で活性化されることも判明した。

- 5      本酵素の N 末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 4 7 3 A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列 N 末端ヒスチジンーバリニンーセリンーアラニンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーロイシンの N 末端アミノ酸配列を有していることが
- 10      わかった。

- この N 末端アミノ酸配列結果を実験 5 - 1 のバチルス グロビスポルス C 9 由来及び実験 8 - 1 のバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の N 末端配列と比較すると、第 1 番目及び第 4 番目、第 9 番目のアミノ酸が異なるものの類似性が
- 15      高いことが判明した。

#### 実験 1 2 - 2    $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験 1 1 - 3 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w/v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 112,000  $\pm$  20,000 ダルトンであった。

精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を 2 w/v % アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は pI 約 7.8  $\pm$  0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を第 25 図（温度の影響）、第 26 図（pH の影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、30 分間反応で約 50  $^{\circ}\text{C}$ 、至適 pH は、35  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応で約 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0）を各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4  $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第 27 図（温度安定性）、第 28 図（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 45  $^{\circ}\text{C}$  までで、pH 安定性は約 4.5 乃至 10.0 であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 14 に示す。

表 1 4

金属イオン	相 対 活 性 (%)	金属イオン	相 対 活 性 (%)
無添加	1 0 0	H g <sup>2+</sup>	0 . 5
Z n <sup>2+</sup>	7 5	B a <sup>2+</sup>	1 0 2
M g <sup>2+</sup>	9 5	S r <sup>2+</sup>	9 1
C a <sup>2+</sup>	1 0 0	P b <sup>2+</sup>	6 9
C o <sup>2+</sup>	9 2	F e <sup>2+</sup>	9 7
C u <sup>2+</sup>	1 5	F e <sup>3+</sup>	9 0
N i <sup>2+</sup>	9 1	M n <sup>2+</sup>	1 0 1
A l <sup>3+</sup>	9 4	E D T A	9 2

表 1 4 の結果から明らかなように、本酵素活性は、H g <sup>2+</sup>で著しく阻害され、C u <sup>2+</sup>で阻害された。また、C a <sup>2+</sup>で活性化されないことも、E D T Aで阻害されないこともわかった。

本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 4 7 3 A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 3 に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリニンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。このN末端アミノ酸配列結果を実験 5 - 2 のバチルス グロビスポルス C 9 由来及び実験 8 - 2 のバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のN末端配列と比較して、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 4 に示すアミノ酸配列のイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリニンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

実験 1 3  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のアミノ酸配列

5 実験 1 3-1  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 1 1-2 の方法で得られた精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品の一部を 1 0 m M トリス-塩酸緩衝液 (p H 9 . 0) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 m g / m l の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 m l) に 2 0  $\mu$  g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、3 0  $^{\circ}$  C、2 4 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 H P L C を行なった。『マイクロボンドスフェア C 1 8 カラム』 (直径 3 . 9 m m  $\times$  長さ 1 5 0 m m、ウオーターズ社製) を用い、流速 0 . 9 m l / 分、室温で 0 . 1 % トリフルオロ酢酸-8 % アセトニトリル溶液から 0 . 1 % トリフルオロ酢酸-3 6 % アセトニトリル溶液の 1 2 0 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 2 1 0 n m の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [P N 5 9 (保持時間約 5 9 分)、P N 6 7 (保持時間約 6 7 分)、P N 8 7 (保持時間約 8 7 分)] を分取し、それぞれ真空乾燥した後、2 0 0  $\mu$  l の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸-5 0 % アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 1 2 乃至 1 4 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 1 5 に示す。



表 1 5

ペプチド 名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P N 5 9	アスパラギン酸－フェニルアラニン－セリン－アスパラギン－アスパラギン－プロリン－スレオニン－バリン
P N 6 7	チロシン－スレオニン－バリン－アスパラギン－アラニン－プロリン－アラニン－アラニン
P N 8 7	チロシン－グルタミン酸－アラニン－グルタミン酸－セリン－アラニン－グルタミン酸－ロイシン

実験 1 3－2  $\alpha$ －イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列

- 実験 1 1－3 の方法で得られた精製  $\alpha$ －イソマルトシル転移酵素標品の一部を 1 0 m M トリス－塩酸緩衝液 (p H 9 . 0 ) に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 m g / m l の濃度になるように希釈した。この試料液 ( 1 m l ) に 2 0  $\mu$  g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、3 0  $^{\circ}$  C、2 4 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 H P L C を行なった。『マイクロボンドスフェア C 1 8 カラム』 (直径 3 . 9 m m  $\times$  長さ 1 5 0 m m、ウオーターズ社製) を用い、流速 0 . 9 m l / 分、室温で 0 . 1 % トリフルオロ酢酸－4 % アセトニトリル溶液から 0 . 1 % トリフルオロ酢酸－4 2 . 4 % アセトニトリル溶液の 9 0 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 2 1 0 n m の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [ P N 2 1 (保持時間約 2 1 分)、P N 3 8 (保持時間約 3 8 分)、P N 6 9 (保持時間約 6 9 分) ] を分取し、それぞれ真空乾燥した後、2 0 0  $\mu$  l の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸－5 0 % アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基まで (但し、P N 2 1 は 6 残基まで) アミノ酸配列を分析したところ、配列表にお

ける配列番号 15 乃至 17 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 16 に示す。

表 16

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P N 2 1	アスパラギンートリプトファンートリプトファンーメチオニンーセリンーリジン
P N 3 8	スレオニンーアスパラギン酸ーグリシンーグリシンーグルタミン酸ーメチオニンーバリニンートリプトファン
P N 6 9	アスパラギンーイソロイシンーチロシンーロイシンープロリンーグルタミンーグリシンーアスパラギン酸

5

実験 14 アルスロバクター グロビホルミス A 19 からの  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産

澱粉部分分解物『パインデックス # 4』4.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v %、リン酸二カリウム 0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム・12 水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05 w/v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター グロビホルミス A 19 (FERM BP-7590) を接種し、27 °C、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量 30 L のファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27 °C とした後、種培養液 1 v/v % を接種し、温度 27 °C、pH 6.0 乃至 9.0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約 1.1 単位/ml で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性は約 1.7 単位/ml で、環状四糖生成活性は約 0.35 単位/ml であり、遠心分離 (

10,000 rpm、30分間)して回収した上清約18Lの酵素活性を測定したところ、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約1.06単位/mlの活性(総活性約19,100単位)で、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は約1.6単位/mlの活性(総活性約28,800単位)で、環状四糖生成活性は約0.27単位/ml(総活性約4,860単位)であった。

なお、アルスロバクター グロビホルミス A19由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定は、基質のための緩衝液として100mMグリシン-NaOH緩衝液(pH8.4)を用いた以外、  
10 実験3に記載の方法と同様に行った。

実験15 アルスロバクター グロビホルミス A19由来酵素の調製

実験15-1 アルスロバクター グロビホルミス A19由来酵素の精製

15 実験14で得られた培養上清約18Lを60%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000 rpm、30分間)して回収し10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約850mlを得た。この粗酵素液は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8,210単位、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性を約15,700単位、環状四糖生成活性を約2,090単位を有することが判明した。この粗酵素液を、東ソー株式会社製『DEAE-Toyopearl 650S』ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量380ml)に供した。酵素活性は、『DEAE-Toyopearl 650S』ゲルに吸着し、NaCl濃度0Mから0.5Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、本発明の $\alpha$ -イソマル

20

25

トシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とは分離して溶出し、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、NaClのリニアグラジエントでその濃度が約0.2M付近に溶出し、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性はNaClのリニアグラジエントで  
5 その濃度が約0.3M付近に溶出した。そこで、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素活性画分とを別々に集め回収した。また、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と $\alpha$ -イ  
10 ソマルトシル転移酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素と $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

以下、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソ  
15 マルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

#### 実験15-2 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠  
20 心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー(ゲル量500ml)に供した。酵素活性は、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエ  
25 ントで溶出させたところ、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0.2M付

近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収し、最終精製標品とした。この精製の各ステップにおける $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表17に示す。

5 表 1 7

工 程	$\alpha$ -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシ ルグルコ糖質生成 酵素比活性 (単位/mg 蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	19, 100	0.11	100
硫酸塩析後の透析液	8, 210	0.48	43.0
イオン交換カラム 溶出液	6, 890	4.18	36.1
アフィニティー カラム溶出液	5, 220	35.1	27.3

精製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

#### 10 実験15-3 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の部分精製

実験15-1に記載のイオン交換クロマトグラフィーによって $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシヤム

15 ・ファルマシア・バイオテク株式会社製『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークラムクロマトグラフィー(ゲル量500ml)に供した。本酵素は、『セフ

- アクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収し、部分精製酵素標品とした。この精製の各ステップにおける  $\alpha$  -
- 5 イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表 1 8 に示す。

表 1 8

工 程	$\alpha$ - イソマルトシル転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ - イソマルトシル転移酵素比活性 (単位 / m g 蛋白質)	収 率 ( % )
培養上清	2 8 , 8 0 0	0 . 1 8	1 0 0
硫酸塩析後の透析液	1 5 , 7 0 0	0 . 9 7	5 4 . 5
イオン交換カラム溶出液	7 , 1 3 0	4 . 0 1	2 4 . 8
アフィニティーカラム溶出液	1 , 8 0 0	1 1 . 9	6 . 3

- 部分精製した  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素標品を 7 . 5 % w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を
- 10 検定したところ、メインの蛋白バンド以外に、3 種のマイナーな蛋白バンドが認められた。

実験 1 6  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素の性質

- 15 実験 1 6 - 1  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質

実験 1 5 - 2 の方法で得た精製  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7 . 5 w / v % ) に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測

定したところ、分子量約 94,000 ± 20,000 ダルトンであった。

精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を 2 w/v % アン  
フォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電  
5 点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドお  
よびゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は  
pI 約 4.3 ± 0.5 であった。

本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調  
べた。なお、温度の影響については、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下と 1 mM 存在下  
10 で測定した。これらの結果を第 29 図（温度の影響）、第 30 図（pH  
の影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 8.4、60 分間反応  
で約 60 °C（ $\text{Ca}^{2+}$  非存在）、約 65 °C（ $\text{Ca}^{2+}$  1 mM 存在）、至適  
pH は、35 °C、60 分間反応で約 8.4 であった。本酵素の温度安  
定性は、酵素溶液（20 mM グリシン-NaOH 緩衝液、pH 8.0  
15 ）を  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下または 1 mM 存在下で各温度に 60 分間保持し、  
水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、  
pH 安定性は、本酵素を各 pH 5.0 mM 緩衝液中で 4 °C、24 時間保  
持した後、pH を 8.0 に調整し、残存する酵素活性を測定すること  
により求めた。それぞれの結果を第 31 図（温度安定性）、第 32 図  
20 （pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 55 °C まで（ $\text{Ca}^{2+}$   
 $^{+}$  非存在）、約 60 °C まで（ $\text{Ca}^{2+}$  1 mM 存在）で、pH 安定性は約 5  
.0 乃至 9.0 であった。

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存  
在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 19 に示す。

表 1 9

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	1 0 0	H g <sup>2+</sup>	0
Z n <sup>2+</sup>	5 6	B a <sup>2+</sup>	9 9
M g <sup>2+</sup>	9 7	S r <sup>2+</sup>	1 0 2
C a <sup>2+</sup>	1 0 6	P b <sup>2+</sup>	4 3
C o <sup>2+</sup>	9 3	F e <sup>2+</sup>	3 6
C u <sup>2+</sup>	0	F e <sup>3+</sup>	3 5
N i <sup>2+</sup>	4 6	M n <sup>2+</sup>	9 8
A l <sup>3+</sup>	3 7	E D T A	2

表 1 9 の結果から明らかなように、本酵素活性は、H g <sup>2+</sup>、C u <sup>2+</sup>、E D T A で著しく阻害されることが判明した。

- 5     本酵素の N 末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル 4 7 3 A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列 N 末端アラニンープロリンーロイシンーグリシンーバリンーグルタミンーアルギニンーアラニンーグルタミンーフェニルアラニンーグルタミンーセリンーグリシンの N 末端アミノ酸配列を有していることがわかった。
- 10

#### 実験 1 6 - 2   α-イソマルトシル転移酵素の性質

- 実験 1 5 - 3 の方法で得た部分精製 α-イソマルトシル転移酵素標品を用いて、本酵素活性に及ぼす温度、p H の影響を活性測定の方法
- 15   に準じて調べた。結果を第 3 3 図（温度の影響）、第 3 4 図（p H の影響）を示した。酵素の至適温度は、p H 6 . 0、3 0 分間反応で約 5 0 °C、至適 p H は、3 5 °C、3 0 分間反応で約 6 . 5 であった。本



酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH 5.0 mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第35図（温度安定性）、第36図（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約45℃までで、pH安定性は約4.5乃至9.0であった。

#### 実験17 アルスロバクター ラモサス S1からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の生産

澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0 w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v%、リン酸二カリウム0.1 w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06 w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05 w/v%及び水からなる液体培地を、500 ml容三角フラスコに100 mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター ラモサス S1（FERM BP-7592）を接種し、27℃、230 rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養液とした。容量30 Lのフエーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20 L入れて、加熱滅菌、冷却して27℃とした後、種培養液1 v/v%を接種し、27℃、pH 6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約0.45単位/mlであり、遠心分離（10,000 rpm、30分間）して回収した上清約18 Lの本酵素活性は、0.44単位/ml（総酵素活性約7,920単位）であった。

### 実験 18 アルスロバクター ラモサス S 1 からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 17 で得られた培養上清約 18 L を 80 % 飽和硫安液で塩析して 4 °C、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000 rpm、30 分間）して回収し 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解後、同緩衝液に対して透析して、本酵素活性を 6,000 単位含む粗酵素液約 380 ml を得た。この粗酵素液を、1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に透析し、その透析液を、遠心分離して不溶物を除いた後、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー（ゲル量 500 ml）に供した。本酵素は、セファクリル HR S-200 ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエント及び、これに続いてマルトテトラオース 0 w/v % から 5 w/v % のリニアグラジエントで溶出させたところ、マルトテトラオース濃度約 2 w/v % 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、酵素画分を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチル・トヨパール（Butyl-ToyopEARL）650 M』ゲルを用いた疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量 380 ml）に供した。本酵素は、ブチル・トヨパール 650 M ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収して、精製標品とした。この精製の各ステップに於ける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性量、比活性、収率を表 20 に示す。

表 2 0

工 程	$\alpha$ - イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ - イソマルト シル転移酵素比 活性 (単位 / m g 蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	7, 9 2 0	0 . 4 7	1 0 0
硫安塩析後の 透析液	6, 0 0 0	3 . 3 6	7 5 . 8
アフィニティー カラム溶出液	5, 2 7 0	2 9 . 9	6 6 . 5
疎水カラム溶出液	4, 4 3 0	3 1 . 1	5 5 . 9

7 . 5 w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含む S D S - P A G E に  
より、本実験で精製した  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素標品の純度を検  
5 定したところ、本酵素標品の蛋白バンドは単一で、純度の高い標品で  
あった。

#### 実験 1 9 $\alpha$ - イソマルトシル転移酵素の性質

実験 1 8 の方法で得た精製  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素標品を S D  
10 S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7 . 5 w / v % )  
に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボ  
ラトリーズ株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測定したところ、  
分子量約 1 1 6 , 0 0 0  $\pm$  2 0 , 0 0 0 ダルトンであった。

本精製  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素標品を 2 w / v % 『アンフォラ  
15 イン』 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製造) 含有等電点  
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及び  
ゲルの p H を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点 (p I  
) は約 4 . 2  $\pm$  0 . 5 であった。

本酵素の酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。その結果を第37図（温度の影響）、第38図（pHの影響）に示した。本酵素の至適温度は、pH 6.0、30分間反応で約50℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約6.0であった。

- 5 本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素をpHの異なる50 mM緩衝液中で、4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を第39図（温度安定性）、第40図（pH安定性）に示した。これらの図に示されるとおり、本酵素の上記の条件下における安定温度域は約45℃以下であり、また、本酵素の上記の条件下における安定pH域はpH約3.6乃至約9.0であった。
- 10

- 本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1 mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表21に示す。
- 15

表 2 1

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	0.1
Zn <sup>2+</sup>	78	Ba <sup>2+</sup>	97
Mg <sup>2+</sup>	99	Sr <sup>2+</sup>	101
Ca <sup>2+</sup>	103	Pb <sup>2+</sup>	85
Co <sup>2+</sup>	91	Fe <sup>2+</sup>	105
Cu <sup>2+</sup>	2	Fe <sup>3+</sup>	75
Ni <sup>2+</sup>	87	Mn <sup>2+</sup>	98
Al <sup>3+</sup>	93	EDTA	91

表 2 1 の結果から明らかなように、本酵素活性は、 $Hg^{2+}$ で著しく阻害され、 $Cu^{2+}$ でも阻害された。また、 $Ca^{2+}$ で活性化されないことも、EDTAで阻害されないことも判明した。

本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル  
5 4 7 3 A』（アプライドバイオシステムズ社製造）を用いて分析した。本酵素のN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号 1 9 に示す、アスパラギン酸－スレオニン－ロイシン－セリン－グリシン－バリン－フェニルアラニン－ヒスチジン－グリシン－プロリンで表される配列であることが判明した。

10

#### 実験 2 0 各種糖質への作用

各種糖質を用いて、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質になりうるかどうかの試験をした。マルトース、マルトトリ  
15 オース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシドを含む溶液を調製した。  
20

これらの溶液に、実験 4 - 2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 9 由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、または実験 7 - 2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、実験 1 1 - 2 の方法  
25 で得たバチルス グロビスポルス N 7 5 由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、実験 1 5 - 2 の方法で得たアルスロバクタ

一 グロビホルミス A 1 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を基質固形物 1 グラム当たりそれぞれ 2 単位ずつ加え、基質濃度を 2 w / v % になるように調整し、これを 3 0 °C、p H 6 . 0 (アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の酵素の場合、p H 8 . 4) で 2 4 時間作用させた。酵素反応前後の反応液を、実験 1 記載の T L C 法で分析し、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果を表 2 2 に示す。

10

15

20

25

表 2 2

基 質	酵 素 作 用			
	C 9 酵素	C 1 1 酵素	N 7 5 酵	A 1 9 酵素
マルトース	+	+	+	+
マルトトリオース	++	++	++	++
マルトテトラオース	+++	+++	+++	+++
マルトペンタオース	+++	+++	+++	+++
マルトヘキサオース	+++	+++	+++	+++
マルトヘプタオース	+++	+++	+++	+++
イソマルトース	—	—	—	—
イソマルトトリオース	—	—	—	—
パノース	—	—	—	—
イソパノース	++	++	++	++
トレハロース	—	—	—	—
コージビオース	+	+	+	+
ニゲロース	+	+	+	+
ネオトレハロース	+	+	+	+
セロビオース	—	—	—	—
ゲンチビオース	—	—	—	—
マルチトール	—	—	—	—
マルトトリイトール	+	+	+	+
ラクトース	—	—	—	—
スクロース	—	—	—	—
エルロース	+	+	+	+
セラギノース	—	—	—	—
マルトシルグルコシド	++	++	++	++
イソマルトシルグルコシド	—	—	—	—

注) 酵素反応前後で、

「—」は、変化がなかったことを示し、

「+」は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物が認められたことを示し、

5

「++」は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物が認められたことを示し、

「+++」は、基質のスポットが殆ど消失し、他の生成物が認めら

れたことを示す。

表 2 2 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、試験した多種の糖質のうち、グルコース重合度  
5 3 以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質によく作用することが判明した。また、グルコース重合度が 2 の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイ  
トール、エルロースにも僅かに作用することが判明した。

## 10 実験 2 1 マルトオリゴ糖からの生成物

### 実験 2 1 - 1 生成物の調製

濃度 1 % のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースのそれぞれ水溶液に実験 7 - 2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、それぞれ固形物 1 グラム  
15 当たり 2 単位（マルトースおよびマルトトリオース）、0. 2 単位（マルトテトラオース）、0. 1 単位（マルトペンタオース）加え、35℃、pH 6. 0 で 8 時間作用させ、100℃で 10 分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の糖組成を、HPLC 法を用いて測定した。HPLC は、『YMC Pack ODS-AQ303』カラム  
20 ム（株式会社ワイ・エム・シー製造）を用いカラム温度 40℃、流速 0. 5 ml/min 水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。その結果を表 2 3 に示す。



表 2 3

反応で生成した糖質の種類	基 質			
	マルトース	マルトトリオース	マルトテトラオース	マルトペンタオース
グルコース	8. 5	0. 1	0. 0	0. 0
マルトース	78. 0	17. 9	0. 3	0. 0
マルトトリオース	0. 8	45. 3	22. 7	1. 9
マルトテトラオース	0. 0	1. 8	35. 1	19. 2
マルトペンタオース	0. 0	0. 0	3. 5	34. 4
マルトヘキサオース	0. 0	0. 0	0. 0	4. 6
イソマルトース	0. 5	0. 0	0. 0	0. 0
グルコシルマルトース	8. 2	1. 2	0. 0	0. 0
グルコシルマルトトリオース	2. 4	31. 5	6. 8	0. 0
X	0. 0	2. 1	30. 0	11. 4
Y	0. 0	0. 0	1. 4	26. 8
Z	0. 0	0. 0	0. 0	1. 7
その他	0. 6	0. 1	0. 2	0. 0

表中の

グルコシルマルトースは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース (別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース) で、  
 グルコシルマルトトリオースは、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース(別名、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース) で、  
 Xは、実験11-2に記載の $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオース (別名、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース) で、  
 Yは、実験11-2に記載の $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオース (別名、 $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース)で、  
 Zは、未同定の糖質である。

表 2 3 の結果から明らかなように、本酵素の作用の結果、基質マル

トースからは、主にグルコースと $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）とが生成し、基質マルトトリオースからは、主にマルトースと $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）とが生成し、少量ながらグルコース、マルトテトラオース、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）、生成物Xが生成することが判明した。基質マルトテトラオースからは、主にマルトトリオースと生成物Xとが生成し、少量ながらマルトース、マルトペンタオース、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^3$ -O- $\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）、生成物Yが生成することが判明した。基質マルトペンタオースからは、主にマルトテトラオースと生成物Yとが生成し、少量ながらマルトトリオース、マルトヘキサオース、生成物X、生成物Zが生成することが判明した。

基質マルトテトラオースからの主生成物である生成物X、並びに基質マルトペンタオースからの主生成物である生成物Yの単離・精製を行った。分取用HPLCカラム『YMC-Pack ODS-AR 355-15S-15 12A』（株式会社ワイエムシイ製）を用いて精製し、上記のマルトテトラオースからの反応物、マルトペンタオースからの反応物それぞれから、純度99.9%以上の生成物X標品を固形物収率約8.3%で、純度99.9%以上の生成物Yを固形物収率約11.5%で単離した。

## 実験21-2 生成物の構造解析

実験21-1の方法で得た生成物Xおよび生成物Yを用いて、常法に従ってメチル化分析とNMR分析を行なった。メチル化分析の結果は表24にまとめた。NMR分析の結果については、 $^1\text{H}$ -NMRスペ

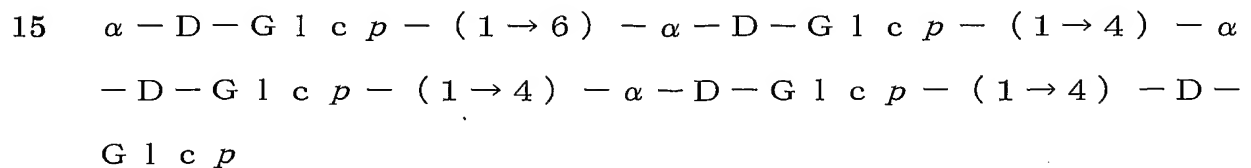
クトルを第 4 1 図（生成物 X）、第 4 2 図（生成物 Y）に、 $^{13}\text{C}-\text{N}$  MR スペクトルを第 4 3 図（生成物 X）、第 4 4 図（生成物 Y）に、生成物 X、Y の帰属を表 2 5 にまとめた。

5 表 2 4

分 析 メ チ ル 化 物 の 種 類	組 成 比	
	生成物 X	生成物 Y
2, 3, 4-トリメチル化物	1. 0 0	1. 0 0
2, 3, 6-トリメチル化物	3. 0 5	3. 9 8
2, 3, 4, 6-テトラメチル化物	0. 8 2	0. 8 5

これらの結果から、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によるマルトテトラオースからの生成物 X は、マルトテトラオースの非還元末端グルコースの 6 位水酸基にグルコース基が  $\alpha$  結合した 5  
10 糖で、構造式 1 で表わされる  $\alpha$ -イソマルトシルマルトトリオース（別名、 $6^4-\text{O}-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）であることが判明した。

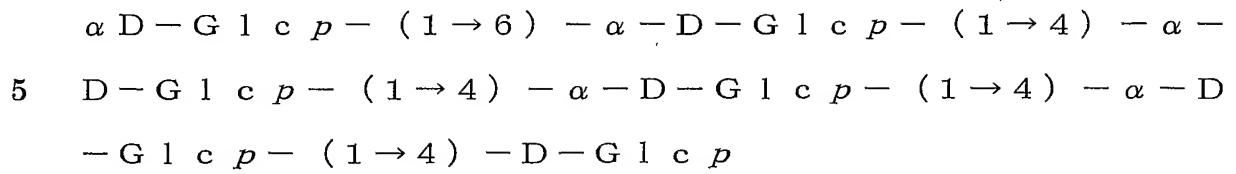
構造式 1 :



また、マルトペンタオースからの生成物 Y は、マルトペンタオース  
20 の非還元末端グルコースの 6 位水酸基にグルコシル基が  $\alpha$  結合した 6 糖で、構造式 2 で表わされる  $\alpha$ -イソマルトシルマルトテトラオース（別名、 $6^5-\text{O}-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース）であることが

判明した。

構造式 2 :



10

15

20

25

表 2 5

グルコース番号	炭素番号	NMR化学シフト値 (p p m)	
		生成物 X	生成物 Y
a	1 a	100.8	100.8
	2 a	74.2	74.2
	3 a	75.8	75.7
	4 a	72.2	72.2
	5 a	74.5	74.5
	6 a	63.2	63.1
b	1 b	102.6	102.6
	2 b	74.2	74.2
	3 b	75.8	75.7
	4 b	72.1	72.1
	5 b	74.0	74.0
	6 b	68.6	68.6
c	1 c	102.3	102.3
	2 c	74.2	74.2
	3 c	76.0	76.0
	4 c	79.6	79.5
	5 c	73.9	73.9
	6 c	63.2	63.1
d	1 d	102.2	102.3
	2 d	74.0 ( $\alpha$ ), 74.4 ( $\beta$ )	74.2
	3 d	76.0	76.0
	4 d	79.8	79.5
	5 d	73.9	73.9
	6 d	63.2	63.1
e	1 e	94.6 ( $\alpha$ ), 98.5 ( $\beta$ )	102.1
	2 e	74.2 ( $\alpha$ ), 76.7 ( $\beta$ )	74.0 ( $\alpha$ ), 74.4 ( $\beta$ )
	3 e	75.9 ( $\alpha$ ), 78.9 ( $\beta$ )	76.0
	4 e	79.6 ( $\alpha$ ), 79.4 ( $\beta$ )	79.8
	5 e	72.6 ( $\alpha$ ), 77.2 ( $\beta$ )	73.9
	6 e	63.4 ( $\alpha$ ), 63.4 ( $\beta$ )	63.1
f	1 f		94.6 ( $\alpha$ ), 98.5 ( $\beta$ )
	2 f		74.2 ( $\alpha$ ), 76.7 ( $\beta$ )
	3 f		76.0 ( $\alpha$ ), 78.9 ( $\beta$ )
	4 f		79.6 ( $\alpha$ ), 79.5 ( $\beta$ )
	5 f		72.6 ( $\alpha$ ), 77.2 ( $\beta$ )
	6 f		63.3 ( $\alpha$ ), 63.3 ( $\beta$ )

以上のことから、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のマルトオリゴ糖に対する作用は以下のように判断された。

(1) 本酵素は、基質として、 $\alpha$ -1, 4結合からなるグルコース重合度が2以上のマルトオリゴ糖に作用し、その非還元末端のグルコシル残基を他の分子の非還元末端のグルコシル残基の6位に転移する作用を有する分子間の6-グルコシル転移を触媒して、非還元末端に6-O- $\alpha$ -グルコシル基を有するグルコース重合度が1増加した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質（別名、6-O- $\alpha$ -グルコシルマルトオリゴ糖）と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを生成する。

(2) 本酵素は、4-グルコシル転移も僅かに触媒し、マルトオリゴ糖から、グルコース重合度が1増加したマルトオリゴ糖と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを僅かに生成する。

## 15 実験22 還元力生成試験

本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が還元力生成能を有するかどうかを調べるため、以下の試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たバチルス グロビスポルスC9由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルスC11由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、実験11-2の方法で得たバチルス グロビスポルスN75由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、実験15-2の方法で得たアルスロバクター グロビホルミスA19由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を、基質固形物1グラム当たり0.25単位加え、35℃、pH6.0（アルスロバクター グロビホルミスA19由来の酵素の場合、

p H 8 . 4 ) で作用させ、その反応液の一部を経時的に採り、100℃で10分間保持して反応を停止し、反応液の還元力を測定した。即ち、その酵素反応前後の溶液の還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定し、また、同時にその酵素反応前後の溶液の全糖量をアントロン硫酸法で測定し、還元力生成率 (%) は以下の計算式を用いて算出した。

計算式：

$$\text{還元力生成率 (\%)} = \left[ \frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} \right] - \left[ \frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right] \times 100$$

結果を表 2 6 に示す。

10

表 2 6

反応 時間 (時間)	還元力率 (%)			
	C 9 酵素	C 1 1 酵素	N 7 5 酵素	A 1 9 酵素
0	0 . 0	0 . 0	0 . 0	0 . 0
1	0 . 0	0 . 1	0 . 1	0 . 0
2	0 . 1	0 . 0	0 . 0	0 . 1
4	0 . 1	0 . 1	0 . 0	0 . 0
8	0 . 0	0 . 0	0 . 1	0 . 1

表 2 6 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、マルトテトラオースを基質として作用させると、  
 15 反応物の還元力を実質的に増加しないこと、即ち、当該  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は加水分解作用を示さないか若しくは検出

できないほど僅かなものであることが判明した。

### 実験 2 3 デキストラン生成試験

本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素がデキストラン生  
5 成作用を有するかどうかを調べるため、『バイオサイエンス・バイオ  
テクノロジー・アンド・バイオケミストリー (B i o s c i e n c e  
B i o t e c h n o l o g y a n d B i o c h e m i s t r y  
10 2 の方法で得た C 9 株由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成  
酵素および実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1  
株由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、実験 1 1-2  
の方法で得たバチルス グロビスポルス N 7 5 株由来の精製  $\alpha$ -イソ  
マルトシルグルコ糖質生成酵素、実験 1 5-2 の方法で得たアルスロ  
15 バクター グロビホルミス A 1 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグル  
コ糖質生成酵素標品を、基質固形物 1 グラム当たり 0. 2 5 単位加え、  
3 5 °C、p H 6. 0 (アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 酵素  
の場合、p H 8. 4) で 4 時間および 8 時間作用させた後、1 0 0 °C  
で 1 5 分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の 5 0  $\mu$  l を遠  
20 心管に入れ、それに 3 倍量のエタノールを加え十分に攪拌した後、4  
°C で 3 0 分間静置した。次いで、遠心分離 (1 5, 0 0 0 r p m、5  
分間) し、その上清を除去した後、1 m l の 7 5 w / w % のエタノー  
ルを加え攪拌して洗浄した。再度、遠心分離してその上清を除き、真  
空乾燥した後、1 m l の脱イオン水を加え十分に攪拌した。その液中  
25 の全糖量 (グルコース換算) をフェノール硫酸法で測定し、試験の全  
糖量とした。反応のブランクとして、1 0 0 °C で 1 0 分間熱処理し失



## 107

活させたバチルス グロビスポルス C 9 由来またはバチルス グロビスポルス C 1 1 由来、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて同様に行い、ブランクの全糖量とした。

5 デキストラン生成量は以下の計算式で計算した。

計算式：

$$\text{デキストラン生成量 (mg/ml)} = [(\text{試験の全糖量}) - (\text{ブランクの全糖量})] \times 20$$

10

結果を表 2 7 に示す。

表 2 7

反応 時間 (時間)	生成デキストラン (mg/ml)			
	C 9 酵素	C 1 1 酵素	N 7 5 酵素	A 1 9 酵素
4	0 . 0	0 . 0	0 . 0	0 . 0
8	0 . 0	0 . 0	0 . 0	0 . 0

15 表 2 7 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトテトラオースに作用させてもデキストランを生成しないこと、つまり、当該  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、デキストラン生成作用を実質的に有さないか、その生成量は検出限界以下であることが判明した。

20

## 実験 2 4 転移受容体特異性

各種糖質を用いて、本酵素の転移受容体になりうるかどうかの試験をした。D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、  
5 D-フコース、D-プシコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル- $\alpha$ -グルコシド、メチル- $\beta$ -グルコシド、N-アセチル-グルコサミン、ソルビトール、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、グリセロール、マルチトール、ラクトース、スクロース、 $\alpha$ -サイクロデキストリン、  
10  $\beta$ -サイクロデキストリン、 $\gamma$ -サイクロデキストリン、L-アスコルビン酸の溶液を調製した。

これらの受容体溶液（濃度 1.6 %）に、糖供与体として澱粉部分分解物『パインデックス # 100』（濃度 4 %）を加え、実験 4-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品または実験 7-2 の方法で得たバチルス  
15 グロビスポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、実験 11-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス N 75 株由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、実験 15-2 の方法で得たアルスロバクター グロビホルミス A 19 由来の  
20 精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を糖供与体固形物 1 グラム当たりそれぞれ 1 単位ずつ加え、これを 30 °C、pH 6.0（アルスロバクター グロビホルミス A 19 酵素の場合、pH 8.4）で 24 時間作用させた。酵素反応後の反応液を、受容体が単糖または二糖の場合はガスクロマトグラフィー法（以下、「GLC 法」と略する。）で、受容体が三糖以上の場合は HPLC 法で分析し、それぞれの糖質が本酵素の転移受容体になるかを確認した。なお、GLC に於

いて、G L C 装置は『G C - 1 6 A』（株式会社島津製作所製）、カラムはジー・エル・サイエンス株式会社製『2 % シリコン O V - 1 7 / クロモゾルブ W』を充填したステンレス製カラム（3 m m  $\phi$   $\times$  2 m）、キャリアーガスは窒素ガスを流量 4 0 m l / 分で 1 6 0  $^{\circ}$ C から 3 2 5  $^{\circ}$ C まで 7 . 5  $^{\circ}$ C / 分の速度で昇温し、検出は水素炎イオン検出器で分析した。H P L C では、H P L C の装置は東ソー株式会社製『C C P D』、カラムは『O D S - A Q - 3 0 3』（株式会社ワイエムシー社製）、溶離液は水を流速 0 . 5 m l / 分で、検出は示唆屈折形で分析した。結果を表 2 8 に示す。

10

表 2 8

糖 質	転 移 生 成 物			
	C 9 酵素	C 1 1 酵素	N 7 5 酵素	A 1 9 酵素
D - グルコース	+	+	+	+
D - キシロース	++	++	++	+
L - キシロース	++	++	++	+
D - ガラクトース	+	+	+	±
D - フラクトース	+	+	+	+
D - マンノース	—	—	—	±
D - アラビノース	±	±	±	±
D - フコース	+	+	+	±
D - プシコース	+	+	+	+
L - ソルボース	+	+	+	+
L - ラムノース	—	—	—	—
メチル - $\alpha$ - グルコース	++	++	++	++
メチル - $\beta$ - グルコース	++	++	++	++

N-アセチルグルコサミン	+	+	+	-
ソルビトール	-	-	-	-
トレハロース	++	++	++	++
イソマルトース	++	++	++	+
イソマルトトリオース	++	++	++	±
セロビオース	++	++	++	++
ゲンチビオース	++	++	++	+
グリセロール	+	+	+	+
マルチトール	++	++	++	++
ラクトース	++	++	++	++
スクロース	++	++	++	++
$\alpha$ -シクロデキストリン	-	-	-	-
$\beta$ -シクロデキストリン	-	-	-	-
$\gamma$ -シクロデキストリン	-	-	-	-
L-アスコルビン酸	+	+	+	+

表中、

「-」は、受容体への糖転移物が検出されなかったを示し、

「±」は、受容体への糖転移物が検出されたが、その生成量が1%未満であったを示し、

- 5 「+」は、受容体への糖転移物が1以上10%未満であったを示し、  
「++」は、受容体への糖転移物が10%以上であったを示す。

表28の結果から明らかなように、本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、転移受容体として種々の糖質が利用でき、バチルス グロビスポルス C9、C11、N75株由来の $\alpha$ -イソマルト  
10 シルグルコ糖質生成酵素は、特に、D-／L-キシロース、メチルー

$\alpha$ -グルコシド、メチルー $\beta$ -グルコシド、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、ラクトースおよびスクロースによく転移し、次いで、D-グルコース、D-フラクトース、D-フコース、D-プシコース、

5 L-ソルボース、N-アセチルグルコサミン、グリセロールおよびL-アスコルビン酸に転移し、更には、D-アラビノースにも転移することが判明し、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 由来の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、特に、メチルー $\alpha$ -グルコシド、メチルー $\beta$ -グルコシド、トレハロース、セロビオース、マルチ

10 トール、ラクトースおよびスクロースによく転移し、次いで、D-グルコース、D-/L-キシロース、D-フラクトース、D-プシコース、L-ソルボース、イソマルトース、ゲンチビオース、グリセロールおよびL-アスコルビン酸に転移し、更には、D-ガラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-フコースおよびイソマルト

15 トリオースにも転移することが判明した。

以上に述べた本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質について、先に報告されている $\alpha$ -グルコシル転移作用を有する酵素、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミ

20 nd Biochemistry)』、第56巻、第169乃至173頁(1992年)に記載のデキストリン・デキストラナーゼおよび『日本農芸化学会誌』、第37巻、第668乃至672頁(1963年)に記載のトランスグルコシダーゼと比較した。その結果を表29にまとめた。

表 2 9

性 質	本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素				デキストリン・デキストラナーゼ	トランスグルコシダーゼ
	C 9 酵素	C 1 1 酵素	N 7 5 酵素	A 1 9 酵素	(対照)	(対照)
加水分解能	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	主に加水分解する
至適 pH	6.0-6.5	6.0	6.0	8.4	4.0-4.2	3.5
EDTA による阻害	阻害される	阻害される	阻害される	阻害される	阻害されない	阻害されない

- 表 2 9 から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、既知のデキストリン・デキストラナーゼやトランスグルコシダーゼとは全く異なる新規な理化学的性質を有することが判明した。

#### 実験 2 5 環状四糖の生成

- 各種糖質を用いて、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の作用による環状四糖生成試験を行なった。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、アミロース、可溶性澱粉、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス # 1 0 0』、松谷化学株式会社製）またはグリコーゲン（カキ由来、和光純薬株式会社販売）の溶液を調製した。
- これらの水溶液（濃度 0.5 %）に、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、実験 7-3 の方法

で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 0 単位とを加え、これらを 3 0 °C、p H 6 . 0 で作用させた。作用条件は、以下の 4 つの系で行った。

- 5    ( 1 )     $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を 2 4 時間作用させた後、酵素を熱失活し、続いて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を 2 4 時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

( 2 )     $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを同時に 2 4 時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

- 10    ( 3 )     $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみを 2 4 時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

( 4 )     $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のみを 2 4 時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

- これら熱失活させた反応液中の環状四糖の生成量を調べるために、  
15    実験 1 と同様の  $\alpha$ -グルコシダーゼ・グルコアミラーゼ処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、H P L C 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 3 0 に示す。





応特性から以下のように推察される。

(1) 本発明の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、グリコーゲンや澱粉部分分解物などの $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に $\alpha$ -イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖が生成する。

(2)  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖が生成する。

(3) 続いて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を $\alpha-1, 4$ グルカン鎖から切り離し、環状化して環状四糖が生成する。

(4) 切り離された $\alpha-1, 4$ グルカン鎖は、再度、(1)から(3)の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素との併用で、上記のように両酵素が繰り返し作用し、環状四糖の生成量が増加すると推察された。

## 実験 26 澱粉液化程度の影響

とうもろこし澱粉を濃度 15%澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを 0.1%加えて pH 6.0 に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『タ

ーマミール 60 L』(ノボ社製)を澱粉 1 グラム当たり 0.2 乃至 2.0 %を加え、95℃で 10 分間反応させ、次いで、120℃で 20 分間オートクレーブし、約 35℃に急冷して、DE 3.2 乃至 20.5 の液化溶液を得、これに、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビ  
 5 スポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 2 単位と、実験 7-3 の方法で得たバチルス グロビ  
 スポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 20 単位とを加え、35℃で 24 時間反応させた。100℃で 15 分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実  
 10 験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 3 1 に示す。

表 3 1

$\alpha$ -アミラーゼ使用量 澱粉当り (%)	D E	環状四糖生成率 (%)
0.2	3.2	54.5
0.4	4.8	50.5
0.6	7.8	44.1
1.0	12.5	39.8
1.5	17.3	34.4
2.0	20.5	30.8

15

表 3 1 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とによる環状四糖の生成は、澱粉の液化の程度で影響を受け、液化の程度が低いほど、即ち、DE が低値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率は高く、逆  
 20 に、液化の程度が高いほど、即ち、DE が高値であるほど、澱粉から

の環状四糖の生成率が低いことが判明した。具体的には、澱粉の部分分解の程度は約 20 以下、望ましくは、DE 約 12 以下、更に望ましくは、DE 約 5 以下が適していることが判明した。

## 5 実験 27 澱粉部分分解物濃度の影響

- 澱粉部分分解物『パインデックス # 100』（DE 約 2 乃至 5）の最終濃度 0.5 乃至 40 % の水溶液を調製し、それぞれに、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、
- 10 実験 7-3 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 10 単位加え、両酵素を併用して 30 °C、pH 6.0 で 48 時間作用させた後、100 °C で 15 分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存
- 15 する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 32 に示す。

表 3 2

パインデックス濃度 (%)	環状四糖生成量 (%)
0.5	63.6
2.5	62.0
5	60.4
10	57.3
15	54.6
20	51.3
30	45.9
40	39.5

表 3 2 の結果から明らかなように、澱粉部分分解物の濃度が 0.5 % の低濃度では、環状四糖の生成量は約 64 % であるのに対し、濃度 5 40 % の高濃度では、環状四糖の生成量は約 40 % と、基質である澱粉部分分解物の濃度に依存して環状四糖の生成量が変化することが判明した。この結果から、環状四糖の生成量は、澱粉部分分解物が低濃度であるほど高まる傾向にあることが判明した。

#### 10 実験 28 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ添加効果

澱粉部分分解物『パインデックス # 100』水溶液（濃度 15 %）を調製し、実験 7-2 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、実験 7-3 の方法で得た C 11 株由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 10 単位と、バチルス ステアロサーモフィルス由来シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（C G T a s e）を固形物 1 グラム当たり 0 乃至 0.

5 単位加え、両酵素を併用して 30℃、pH 6.0 で 48 時間作用させた後、100℃で 15 分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC 法で環状四糖を定量した。それらの結果を表 33 に示す。

表 33

CGTase 添加量(単位)	環状四糖生成量 (%)
0	54.6
2.5	60.1
5	63.1
10	65.2

表 33 の結果から明らかなように、CGTase を添加することによって、環状四糖の生成量が増加することが判明した。

#### 実験 29 環状四糖の調製

トウモロコシ由来フィトグリコーゲン（キューピー株式会社製）の水溶液（約 100 L）を濃度 4 w/v %、pH 6.0、温度 30℃に調整した後、実験 7-2 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物 1 グラム当たり 1 単位と、実験 7-3 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を固形物 1 グラム当たり 10 単位加え、48 時間作用させた後、100℃で 10 分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、HPLC で環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約 84 %であった。この反応液

をpH 5.0、温度45℃に調整した後、実験1と同様に $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、さらに、水酸化ナトリウムでpHを5.8に調整し温度90℃で1時間保持して、酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固形分濃度約16%まで濃縮した後、常法に従って脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約3,700gを含む糖液約6.2kgを得た。

得られた糖液を、オルガノ製イオン交換樹脂『アンバーライトCR-1310 (Na型)』を充填したカラム（ゲル量約225L）に供し、カラム温度60℃で流速約45L/hの条件でクロマト分離を行った。溶出液の糖組成を実験1に記載のHPLC法でモニターし、環状四糖の純度が98%以上の画分を回収し、常法に従って脱塩、脱色、濾過、濃縮したところ、固形分約2,500gを含む糖液約7.5kgを得た。得られた糖液の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は約99.5%であった。

### 実験30 環状四糖の水溶液からの結晶化

実験29の方法で得られた純度約98%以上の環状四糖画分をエバポレーターで固形物濃度約50%に濃縮した後、この濃縮糖液約5kgを円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに回転させながら約20時間で温度を65℃から20℃まで降下させることにより晶析させたところ、白色の結晶状粉末が得られた。その顕微鏡写真の一例を第45図に示す。続いて、遠心濾過器を用いて分離し結晶状物を湿重量として1,360gを回収した。さらに、60℃で3時間乾燥して環状四糖結晶状粉末を1,170g得た。得られた結晶粉末の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は99.9%以上と極

めて高純度であった。

この環状四糖の結晶状粉末を粉末X線回折法で解析したところ、第46図に示すように、主な回折角（ $2\theta$ ）として $10.1^\circ$ 、 $15.2^\circ$ 、 $20.3^\circ$  および  $25.5^\circ$  を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分は $13.0\%$ であることがわかり、環状四糖1分子当たり5乃至6分子の水を含む結晶であることが判明した。

さらに、この環状四糖の結晶粉末を熱重量測定したところ、第47図に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 $150^\circ\text{C}$ までの上昇で4乃至5分子の水に相当する重量減少が認められ、続いて、温度 $250^\circ\text{C}$ 付近で1分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 $280^\circ\text{C}$ 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖5乃至6含水結晶は、常圧において、温度を $150^\circ\text{C}$ まで上昇させることにより結晶分子当たり4乃至5分子の水が離脱して1分子の水を含む結晶になり、さらに温度 $250^\circ\text{C}$ までに1分子の水が結晶から離脱して無水結晶になることが判明した。

### 実験31 環状四糖1含水結晶への変換

実験30の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶粉末をガラス容器に入れ、予め温度 $140^\circ\text{C}$ に保温したオイルバス中にそのガラス容器を30分間保持した。得られた環状四糖粉末を粉末X線回折法で解析したところ、熱処理前の5乃至6含水結晶の粉末X線回折とは全く異なり、第48図に示すように、主な回折角（ $2\theta$ ）として、 $8.3^\circ$ 、 $16.6^\circ$ 、 $17.0^\circ$  および  $18.2^\circ$  を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシ

ヤー法で測定したところ、水分が約 2.7% であることがわかり、環状四糖 1 分子当たり 1 分子の水を含むことが判明した。さらに、この結晶粉末を熱重量測定したところ、第 49 図に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 270℃ 付近で 1 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 290℃ 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖結晶状物は 1 含水結晶であることが判明した。

#### 10 実験 3 2 無水結晶への変換

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を温度 40℃ 乃至 120℃ でそれぞれ 16 時間真空乾燥した。得られた環状四糖粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、真空乾燥温度 40℃ の場合は水分が約 4.2% であり、真空乾燥温度 120℃ の場合は水分が約 0.2% で、実質的に無水であることが判明した。これら真空乾燥した環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、真空乾燥前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折および 1 含水結晶のものとは全く異なり、第 50 図（真空乾燥温度 40℃）、第 51 図（真空乾燥温度 120℃）に示すように、主な回折角（ $2\theta$ ）として、10.8°、14.7°、15.0°、15.7° および 21.5° を特徴とする回折スペクトルが得られた。両回折スペクトル間でのピーク強度の強弱は認められるものの、基本的にピークの回折角度は同一で、結晶学的に同一無水結晶と推察された。また、回折スペクトルのベースラインは山状を呈し、真空乾燥前の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶のものおよび 1 含水結晶のものと比べ結晶化度が低下しており、非結晶状態（アモルファス）の環状四糖が存在していることが判明した。この



ことから、真空乾燥 40℃ の場合の水分を約 4.2% 含む環状四糖粉末は、その水分を含む環状四糖アモルファスと、環状四糖無水結晶とが混在する粉末と推察された。以上のことから、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を真空乾燥することにより、5 乃至 6 含水結晶は水分子を失い、非結晶状態のアモルファスと無水結晶に変換することがわかった。なお、水分 0.2% の無水環状四糖粉末について、実験 31 と同様に熱重量分析したところ、第 52 図に示すように、温度 270℃ 付近から環状四糖の熱分解と考えられる重量減少のみが観察された。

#### 10 実験 33 環状四糖の水に対する飽和濃度

温度 10 乃至 90℃ での水に対する環状四糖の飽和濃度を調べるため、密栓付きガラス製容器に水 10 ml を入れ、それに実験 30 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を、各温度で完全に溶解する量以上の量を加えた後、ガラス容器を密封し、飽和に達するまで温度 10 乃至 90℃ で保温しながら 2 日間攪拌した。それぞれの温度の環状四糖飽和溶液を精密濾過して溶けていない環状四糖を除いた後、その濾液の水分を乾燥減量法で調べ、各温度での飽和濃度を求めた。結果を表 34 に示す。

20 表 34

温度 (℃)	飽和濃度 (%)
10	30.3
30	34.2
50	42.6
70	53.0
90	70.5

## 実験 3 4 熱安定性

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し濃度 1 0 w / v % の環状四糖水溶液を調製し、その溶液 8 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 2 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、H P L C 法による純度測定を行った。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度により評価した。結果は表 3 5 に示す。

表 3 5

加熱時間 (分)	着色度 (A 4 8 0 n m)	純度 (%)
0	0. 0 0	1 0 0
3 0	0. 0 0	1 0 0
6 0	0. 0 0	1 0 0
9 0	0. 0 0	1 0 0

10

表 3 5 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 1 2 0 °C の高温加熱でも着色はなく、糖組成の純度の低下もなく、環状四糖は熱に対して安定な糖質であることが判明した。

## 15 実験 3 5 p H 安定性

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を各種の緩衝液 ( 2 0 m M ) に溶解し、環状四糖を濃度 4 w / v % 、p H を 2 乃至 1 0 に調整した環状四糖溶液を調製した。それぞれの溶液 8 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 0 0 °C で 2 4 時間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、H P L C 法による純度測定を行った。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度により評価した。結果は表 3 6 に示す。

20

表 3 6

pH (緩衝液の種類)	着色度 ( $A_{480nm}$ )	純度 (%)
2. 0 (酢酸)	0. 0 0	9 3
3. 0 (酢酸)	0. 0 0	1 0 0
4. 0 (酢酸)	0. 0 0	1 0 0
5. 0 (酢酸)	0. 0 0	1 0 0
6. 0 (トリス-塩酸)	0. 0 0	1 0 0
7. 0 (トリス-塩酸)	0. 0 0	1 0 0
8. 0 (トリス-塩酸)	0. 0 0	1 0 0
9. 0 (アンモニウム)	0. 0 0	1 0 0
1 0. 0 (アンモニウム)	0. 0 0	1 0 0

表 3 6 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 1 0 0 °C の高温で 2 4 時間加熱しても、p H 2 乃至 1 0 の広範囲で着色はなく、p H 2 において糖組成の純度は僅かに低下するものの、p H 3 乃至 1 0 の範囲では全く糖組成の純度は低下せず、環状四糖は広い p H 範囲、換言すれば、p H 3 乃至 5 の酸性側、p H 6 乃至 8 の中性側、p H 9 乃至 1 0 のアルカリ側で煮沸しても極めて安定な糖質であることが判明した。

10

#### 実験 3 6 アミノカルボニル反応

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し、さらに、それに市販試薬特級のグリシンとリン酸緩衝液を加え、5 0 mMリン酸緩衝液で p H 7. 0 に調整した 1 w / v % グリシンを含む 1 0 w / v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 0 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べ

た。着色度は、480 nmにおける1 cmセルでの吸光度により評価した。結果を表37に示す。

表 3 7

加熱時間 (分)	着色度 ( $A_{480nm}$ )
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

5

表37の結果から明らかなように、環状四糖は、グリシン共存下で加熱しても着色はなく、グリシンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応（メイラード反応とも言う）を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

10

#### 実験37 アミノカルボニル反応

実験30の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶と市販ポリペプトン（日本製薬製）とを脱イオン水に溶かし、5 w/v%ポリペプトンを含む10 w/v%環状四糖溶液を調製した。その溶液4 mlを  
 15 ガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で30乃至90分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。同時に、ポリペプトンのみを含む溶液をブランクとして同様に加熱した。着色度は、480 nmにおける1 cmセルでの吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値に基づいて評価した。結果  
 20 を表38に示す。

表 3 8

加熱時間 (分)	着色度 ( $A_{480nm}$ )
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

表 3 8 の結果から明らかなように、環状四糖は、ポリペプトン共存  
 5 下で加熱して、ポリペプトンとの褐変を引き起こさないこと、換言す  
 れば、アミノカルボニル反応を起こしにくい安定な糖質であることが  
 判明した。

#### 実験 3 8 包接作用

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱イオン水  
 10 に溶かし、20%水溶液を調製した。その水溶液 100 g 当たり、メ  
 タノールは 2 g、エタノールは 3 g、酢酸は 4.6 g を加えて包接を  
 行なった。その後、それぞれを濾過し濾液を凍結乾燥し、未包接物を  
 除去した。対照として、包接能を有することが知られている分枝シク  
 ロデキストリン（商品名『イソエリート P』、マルハ株式会社販売）  
 15 を用いて同様に行なった。

凍結乾燥粉末中の包接物量を測定するために、それぞれの凍結乾燥  
 粉末 1 g を 5 ml の水に溶かし、それに 5 ml のジエチルエーテルを  
 加えて抽出を行ない、再度、抽出を繰り返した後、ジエチルエーテル  
 中の抽出物をガスクロマトグラフィー法で定量した。結果を表 3 9 に  
 20 示す。

表 3 9

包 接 物	包接量 (mg / g - 凍結乾燥粉末)	
	環状四糖	イソエリート P (対照)
メ タ ノ ー ル	6. 7 1	2. 9 2
エ タ ノ ー ル	1 7. 2 6	8. 9 2
酢 酸	6 7. 7 4	3 0. 5 7

表 3 9 の結果から明らかなように、環状四糖は包接能を有しており、その包接能は、分枝サイクロデキストリンと比べ、重量当たり約 2 倍も高いことが判明した。

#### 実験 3 9 甘味度

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱イオン水に溶かして、固形物濃度 1 0 乃至 3 0 % の水溶液とし、これらの水溶液を甘味度試験溶液とした。一方、蔗糖（市販グラニュー糖）6 % 水溶液を基準として、パネラー 8 名で官能試験を行なった。その結果、環状四糖の甘味度は、蔗糖の約 2 7 % であった。

#### 実験 4 0 消化性試験

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『日本栄養食糧学会誌』、第 4 3 巻、第 2 3 乃至 2 9 頁（1 9 9 0 年）に記載の岡田等の方法に準じて、試験管内での唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼ、小腸粘膜酵素による環状四糖の消化性を調べた。対照として、難消化性糖質として知られているマルチトールを用いて行なった。結果を表 4 0 に示す。

表 4 0

消 化 酵 素	消化酵素による分解率 (%)	
	環状四糖	マルチトール (対照)
唾液アミラーゼ	0. 0	0. 0
合成胃液	0. 0	0. 0
膵液アミラーゼ	0. 0	0. 0
小腸粘膜酵素	0. 7 4	4. 0

表 4 0 の結果から明らかなように、環状四糖は、唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼで全く消化されず、小腸粘膜酵素によって  
 5 僅かに消化されたが、その程度は 0. 7 4 % と低値であり、対照の難消化性糖質マルチトールの値と比較すると 1 / 5 以下であり、環状四糖が極めて消化されにくい糖質であることが判明した。

#### 実験 4 1 醗酵性試験

- 10 実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー (Journal of Nutritional Science and Vitaminology)』、第 3 7 巻、5 2 9 乃至 5 4 4 頁 (1 9 9 1 年) に記載の O k u 等の方法に準じて、ラット
- 15 盲腸内容物による環状四糖の発酵性を調べた。盲腸内容物は、ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下で屠殺し嫌氣的に採取し、4 倍量の 0. 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁したものをを用いた。環状四糖は盲腸内容物重量当たり約 7 % を添加し、添加直後および 1 2 時間後に残存する環状四糖量はガスクロマトグラフィー法で定量した。そ
- 20 の結果、添加直後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 6 8. 0 m g、1 2 時間後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 6 3. 0 m g であり、9 3 % が醗酵されず残存していることがわかり、環状四糖は極めて醗

酵されにくい糖質であることが判明した。

#### 実験 4 2 資化性試験

実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『  
5 腸内フローラと食物因子』、光岡知足編、学会出版センター（1984 年）に記載の方法に準じて、各種腸内細菌の資化性を調べた。即ち、予め培養しておいた新鮮な菌を、環状四糖を 0.5% 添加した P Y F 培地 5 m l に約  $10^7$  C F U 接種し、嫌気条件下で 37℃、4 日間培養した。対照として、資化されやすい糖質グルコースを用いて行なった。  
10 資化性の判定は、培養後の培養液の p H が、6.0 以上の場合、資化されない（－）とし、6.0 未満の場合、資化される（＋）とした。さらに、培養液中に残存する糖質をアンスロン法で測定し糖質の減少量を調べ、資化性の判定を確認した。結果を表 4 1 に示す。

15

20

25



表 4 1

腸 内 細 菌 株	資 化 性	
	環 状 四 糖	ゲルコース (対照)
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	—	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	—	+
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	—	+
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	—	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	—	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	—	+

表 4 1 の結果から明らかなように、環状四糖は、試験した腸内細菌

株のいずれにも資化されなく、対照のグルコースはいずれにも資化されることがわかり、環状四糖が腸内細菌に極めて資化されにくい糖質であることが判明した。

#### 5 実験 4 3 急性毒性試験

マウスを使用して、実験 3 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を経口投与して急性毒性試験を行なった。その結果、環状四糖は低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、その  $LD_{50}$  値は、5  
10 0 g / k g マウス体重以上であった。

以上の実験 4 0 乃至 4 3 の結果から、環状四糖は、経口摂取しても、消化、吸収されにくく、無カロリー乃至低カロリーの可食素材として、ダイエット甘味料、高甘味度甘味料の賦形剤、ダイエット飲食物の増粘剤、増量剤、賦形剤、更には、食物繊維、脂肪代替食品材料などと  
15 しての利用が期待できる。

以下、本発明の環状四糖、それを含む糖質の製造方法を実施例 A で、環状四糖、それを含む糖質を含有せしめた組成物を実施例 B で示す。

#### 実施例 A - 1

20 バチルス グロビスポルス C 9 (FERM BP - 7 1 4 3) を実験 3 の方法に準じて、ファーメンターで 4 8 時間培養した。培養後、S F 膜を用いて除菌濾過し、約 1 8 L の培養濾液を回収し、更に、その濾液を U F 膜濃縮し、本発明の  $\alpha$  - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を 8 . 8 単位 / m l と  $\alpha$  - イソマルトシル転移酵素を 2 6 . 7 単  
25 位 / m l とを含む濃縮酵素液約 1 L を回収した。

馬鈴薯澱粉乳を濃度約 2 % 澱粉乳とし、これに最終濃度 1 m M と

るように塩化カルシウムを加え、pH 6.0に調整し、95℃に約20分間加熱して糊化を行い、次いで約35℃に冷却し、これに前記方法で調製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当り0.25 mlの割合になるように加え、pH 6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃縮し、噴霧乾燥して、環状四糖含有粉末を原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース0.7%、イソマルトース1.4%、マルトース11.1%、環状四糖62.1%、およびその他の糖質を24.7%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 実施例A-2

馬鈴薯澱粉を濃度約6%澱粉乳とし、これに濃度0.1%となるように炭酸カルシウムを加え、pH 6.0に調整し、これに $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ターマミール60L』、ノボ社製）を澱粉固形物グラム当り0.2%になるように加え、95℃で10分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実施例A-1の方法で調製した $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮液を澱粉固形物1グラム当り0.25 mlの割合になるよう

に加え、pH 6.0、温度 35℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60%の環状四糖含有シ  
5 ラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90%で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 0.9%、イソマルトース 1.5%、マルトース 11.3%、環状四糖 60.1%、およびその他の糖質を 26.2%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定  
10 剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

### 実施例 A-3

バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を  
15 実験 6 の方法に準じて、ファーメンターで 48 時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約 18 L の培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を 9.0 単位/ml と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を 30.2 単位/ml とを含む濃縮酵素液約 1 L を回収した。タピオカ澱粉を濃度  
20 約 25%澱粉乳とし、これに  $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉固形物グラム当たり 0.2%加え、85乃至90℃で約 20 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷してDE約 4 の液化溶液を得、これに上記の方法で調製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質  
25 生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.25 ml の割合になるように加え、更にシクロ

マルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉固形物 1 グラム当たり 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90%で得た。

本シラップは、固形物当たり、グルコース 38.4%、環状四糖 58.1%、その他の糖質を 3.5%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

## 20 実施例 A-4

とうもろこし澱粉を濃度約 20%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1%加え、pH 6.5に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ（商品名『ターマミール 60 L』、ノボ社製）を澱粉グラム当たり 0.3%加え、95℃で 15 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに実施例 A-3 の方法で得た  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -

- イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当  
り 0.25 ml の割合になるように加え、更にシクロマルトデキスト  
リングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造  
）を澱粉固形物 1 グラム当たり 10 単位になるように加え、pH 6.0、  
5 温度 35 で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保つ  
た後、pH 5.0、温度 50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤  
（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会  
社製造）を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、  
更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工  
10 業株式会社製）を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応  
させ、その反応液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過  
して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびO  
H型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60%  
の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90%で得た。  
15 本シラップは、固形物当り、グルコース 34.2%、環状四糖 62.  
7%、その他の糖質を 3.1%含有しており、温和な甘味、適度の粘  
度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水  
防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食  
物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

20

#### 実施例 A-5

- 実施例 A-3 の方法で得られた環状四糖含有シラップを、強酸性カ  
チオン交換樹脂（商品名『アンバーライト CR-1310（Na 形）  
』、オルガノ株式会社製）を用いたカラム分画を行なった。樹脂を内  
25 径 5.4 cm のジャケット付きステンレス製カラム 4 本に充填し、直  
列につなぎ樹脂層全長 20 m とした。カラム内温度 60℃に維持しつ

つ、糖液を樹脂に対して  $5 \text{ v} / \text{v} \%$  加え、これに  $60^\circ\text{C}$  の温水を  $\text{SV} 0.13$  で流して分画し、溶出液の糖組成を  $\text{HPLC}$  法でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、環状四糖高含有液を原料澱粉固形物当たり収率約  $21\%$  で得た。本高含有液は、固形物当たり約 5 98% の環状四糖を含有していた。

本溶液を濃度約  $70\%$  に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として環状四糖 5 乃至 6 含水結晶約  $2\%$  を加えて徐冷し、晶出率約  $45\%$  のマスキットを得た。本マスキットを乾燥搭上のノズルより  $150 \text{ kg} / \text{cm}^2$  の高圧にて噴霧した。これと同時に  $85^\circ\text{C}$  の熱風を乾燥搭の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より  $45^\circ\text{C}$  の温風を送りつつ、該粉末を乾燥搭外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成搭に充填して温風を送りつつ、 $10$  時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

15      本品は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 実施例 A-6

実施例 A-4 の方法で得られた環状四糖含有シラップを原糖液とし、環状四糖の含量を高めるため、実施例 A-5 の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行なって、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、環状四糖高含有液を原料澱

粉固形物当たり収率約 60% で得た。本高含有液は、固形物当たり約 90% の環状四糖を含有していた。

本溶液を濃度約 85% に濃縮して助晶機にとり、攪拌しつつ徐冷して助晶し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で 2 日間放置し、晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎して環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 実施例 A-7

実施例 A-6 の方法で得られた環状四糖高含有液を、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水スプレーし洗浄して高純度の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を固形物当たり約 55% の収率で得た。

本品は、固形物当たり 98% 以上の高純度環状四糖 5 乃至 6 含水結晶であって、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などにも有利に利用できる。



## 実施例 A-8

- トウモロコシ由来フィトグリコーゲン 5.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』 1.0 w/v %、リン酸二カリウム 0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム・12水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7水塩 0.05 w/v %、及び水からなる液体培地を、容量 30 L のファーマンターに約 20 L 入れて、121℃、20 分間滅菌し、冷却して温度 27℃とした後、実験 6 の方法に準じて種培養したバチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) の種培養液 1 v/v % を接種し、温度 27℃、pH 6.0 乃至 7.0 に保ちつつ、72 時間通気攪拌培養した。その培養液を 121℃、20 分間加熱殺菌した後、冷却し、遠心分離し、その上清を回収し、更に、その上清を UF 膜濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 形および OH 形イオン交換樹脂により脱塩して精製して、環状四糖含有液を原料フィトグリコーゲン固形物当たり収率約 40 % で得た。本含有液は、固形物当たり約 87 % の環状四糖を含有していた。

- 本環状四糖含有液を、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水スプレーし洗浄して純度 98 % 以上の高純度環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を原料フィトグリコーゲン固形物当たり収率約 25 % で得た。

- 本品は、高純度の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶であって、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などにも有利に利用できる。

## 実施例 A-9

バチルス グロビスポルス N75 (FERM BP-7591) を  
実験 10 の方法に準じて、ファーマンターで 48 時間培養した。培養  
5 後、SF 膜を用いて除菌濾過し、約 18 L の培養濾液を回収し、更に、  
その濾液を UF 膜濃縮し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生  
成酵素を 6.0 単位/ml と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を 20.0  
単位/ml とを含む濃縮酵素液約 800 ml を回収した。とうもろこ  
し澱粉を濃度約 30% の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1%  
10 加え、pH 6.5 に調整し、 $\alpha$ -アミラーゼ (商品名『ターマミール  
60L』、ノボ社製) を澱粉グラム当たり 0.3% 加え、95℃で 1  
5 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に  
約 51℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに上記の方法で調  
製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル  
15 転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.4 ml の  
割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトラ  
ンスフェラーゼ (株式会社林原生物化学研究所製造) を澱粉固形物 1  
グラム当たり 3 単位になるように加え、pH 5.5、温度 51℃で 48  
時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.  
20 0、温度 50℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤 (商品名『トラ  
ンスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製) を固形物  
1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミ  
ラーゼ剤 (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製)  
を固形物 1 グラム当たり 20 単位加え、17 時間反応させ、その反応  
25 液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾  
液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 形および OH 形イオン交換

樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して、環状四糖を固形物当り 4  
4.0%含有するシラップを得た。得られた環状四糖含有シラップを  
原糖液とし、環状四糖の含量を高めるため、実施例 A-5 の方法に準  
じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィー  
5 を行なって、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、濃縮し、噴霧  
乾燥して、環状四糖含有粉末を原料澱粉固形物当たり収率約 45%で  
得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 3.7%、環状四糖 80.5%、  
およびその他の糖質を 15.8%含有しており、温和な甘味、適度の  
10 粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離  
水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などと  
して、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用でき  
る。

## 15 実施例 10

アルスロバクター グロビホルミス A19 (FERM BP-75  
90) を実験 14 の方法に準じて、ファーメンターで 48 時間培養し  
た。培養後、SF 膜を用いて除菌濾過し、約 18 L の培養濾液を回収  
し、更に、その濾液を UF 膜濃縮し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシルグ  
ルコ糖質生成酵素を 15.2 単位/ml と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵  
20 素を 23.0 単位/ml とを含む濃縮酵素液約 1 L を回収した。

馬鈴薯澱粉を濃度約 5% 澱粉乳とし、これに濃度 0.1% となるよ  
うに炭酸カルシウムを加え、pH 6.0 に調整し、これに  $\alpha$ -アミラ  
ーゼ（商品名『ターマミール 60 L』、ノボ社製）を澱粉固形物グラ  
ム当り 0.2% になるように加え、95℃で 10 分間反応させ、次い  
25 で 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 40℃に急冷して D

E 約 4 の液化溶液を得、これに上記の方法で調製した  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮液を澱粉固形物 1 グラム当たり 0.5 ml の割合になるように加え、pH 6.0、温度 40℃で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃に  
5 加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 70%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90%で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 2.5%、イソマルトース 6.3%、環状四糖 30.1%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 15 実施例 B-1 甘味料

実施例 A-7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 0.8 重量部に、トレハロース含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）0.2 重量部、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社販売、商品名『 $\alpha$ G スイート』）0.01 重量部、および L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（商品名『アスパル  
20 テーム』）0.01 重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有している。本品のカロリーは、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶が難消化性、難発酵性で実質的に無カロリーであることから、甘味度当たり蔗糖の約 10 分の 1 である。しかも、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である。従って、本品は、高品質の低カロリー、低  
25

う蝕性甘味料として好適である。

#### 実施例 B-2 ハードキャンディー

濃度 55% 蔗糖溶液 100 重量部に実施例 A-2 の方法で得た環状  
5 四糖含有シラップ 50 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2%  
未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 0.6 重量部および適量  
のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。  
本品は歯切れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起こさず、吸湿  
性少なく、ダレも起こさない安定で高品質のハードキャンディーであ  
10 る。

#### 実施例 B-3 チューインガム

ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに無水  
結晶マルチトール 2 重量部、キシリトール 2 重量部、実施例 A-7 の  
15 方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 2 重量部、およびトレハロース  
含水結晶 1 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常  
法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。  
本品は、テクスチャー、呈味、風味良好で、低う蝕性、低カロリーの  
チューインガムとして好適である。

20

#### 実施例 B-4 加糖練乳

原乳 100 重量部に実施例 A-5 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含  
水結晶粉末 2 重量部および蔗糖 2 重量部を溶解し、プレートヒーター  
で加熱殺菌し、次いで濃度 70% に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品  
25 を得た。本品は、温和な甘味で風味も良く、フルーツ、コーヒー、コ  
コア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

## 実施例 B-5 乳酸菌飲料

脱脂粉乳 175 重量部、実施例 A-4 の方法で得た環状四糖含有シ  
ラップ 130 重量部およびラクトスクロース高含有粉末（株式会社林  
5 原商事販売、登録商標『乳果オリゴ』）50 重量部を水 1,150 重  
量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、  
常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部植菌し、37℃で8  
時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好で、オリゴ糖、環  
状四糖を含有し、乳酸菌を安定に保つだけでなく、ビフィズス菌増殖  
10 促進作用、整腸作用を有する乳酸菌飲料として好適である。

## 実施例 B-6 粉末ジュース

噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末 33 重量部に対して、実  
施例 A-7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 50 重量部、  
15 無水結晶マルチトール 10 重量部、無水クエン酸 0.65 重量部、リ  
ンゴ酸 0.1 重量部、2-O- $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸  
0.2 重量部、クエン酸ソーダ 0.1 重量部、プルラン 0.5 重量部  
および粉末香料の適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にして、これ  
を流動層造粒機に仕込み、排風温度 40℃とし、これに実施例 A-5  
20 の方法で得た環状四糖高含有濃縮液をバインダーとして適量スプレー  
し、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有  
率約 30%の粉末ジュースである。又、本品は、異味、異臭がなく、  
高品質で、低カロリーのジュースとして商品価値の高いものである。

## 25 実施例 B-7 カスタードクリーム

コーンスターチ 100 重量部、実施例 A-2 の方法で得た環状四糖

含有シラップ 100 重量部、トレハロース含水結晶 60 重量部、蔗糖 40 重量部、および食塩 1 重量部を十分に混合し、鶏卵 280 重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳 1,000 重量部を徐々に加え、更に火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、風味良好で、澱粉の老化も抑制され、高品質のカスタードクリームである。

#### 10 実施例 B-8 チョコレート

カカオペースト 40 重量部、カカオバター 10 重量部および実験 24 の方法に準じて得た環状四糖 1 含水結晶 50 重量部を混合してレフアイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて 50℃で 2 昼夜練り上げた。この間にレシチン 0.5 重量部を添加して十分に分散させた。次いで、温度調節機で 31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、泡抜きし、10℃の冷却トンネルを通過させて固化させた。これを型抜きして包装し、製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共に良く、内部組織も良好であり、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。又、本品は、低う蝕性、低カロリーのチョコレートとして有用である。

#### 実施例 B-9 ういろうの素

米粉 90 重量部に、コーンスターチ 20 重量部、無水結晶マルチトール 70 重量部、実施例 A-1 の方法で得た環状四糖含有粉末 50 重量部、およびプルラン 4 重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れ

て60分間蒸し上げて抹茶ういろを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。又、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良く、低カロリーのういろとしても好適である。

#### 5 実施例B-10 あん

原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きし、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに蔗糖14重量部、実施例A-3の方法で得た環状四糖含有シラップ5重量部および水4重量部を加えて煮沸し、  
10 これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんを壊さないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。本品は、色焼け、離水もなく安定で、舌触り、風味良好で、あんパン、まんじゅう、団子、最中、氷菓などの製菓材料として好適である。

#### 15 実施例B-11 パン

小麦粉100重量部、イースト2重量部、蔗糖5重量部、実施例A-1の方法で得た環状四糖含有粉末1重量部および無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成、焼き上げた。本品は、色相、すだちとも良好で、  
20 適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

#### 実施例B-12 ハム

豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部および硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500  
25 重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-5の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末40重量部および香辛料か



らなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗淨し、ひもで巻き締め、薫煙し、クッキングし、冷却、包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

#### 5 実施例B-13 粉末ペプチド

- 40%食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社販売、商品名『ハイニース』）1重量部に、実施例A-6の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は風味
- 10 良好で、プレミックス、冷菓などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず、経口流動食、経管流動食のための難消化性の食物繊維、整腸材料としても有用である。

#### 実施例B-14 粉末卵黄

- 15 生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得られる液状卵黄1重量部に対して、実験25の方法に準じて得た環状四糖無水結晶含有粉末4重量部の割合で混合した後、バットに移し、一夜放置して、環状四糖5乃至6含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄
- 20 を得た。

本品は、プレミックス、冷菓、焼菓子、乳化剤などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず経口流動食、経管流動食のための難消化の性食物繊維、整腸材料としても有用である。又、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

25

#### 実施例B-15 浴用剤

ユズの皮ジュース 1 重量部に対して、実験 25 の方法に準じて得た環状四糖無水結晶含有粉末 10 重量部の割合で混合し、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を晶出、熟成させた後、粉末化して、ユズの皮エキス含有環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

- 5 本粉末 5 重量部に、焼塩 90 重量部、トレハロース含水結晶 2 重量部、無水ケイ酸 1 重量部および  $\alpha$ -グルコシルヘスペリジン（株式会社林原販売、商品名  $\alpha$ Gヘスペリジン）0.5 重量部を混合して浴用剤を製造した。

- 10 本品は、ユズの香りも豊かで、入浴用の湯に 100 乃至 10,000 0 倍に希釈して利用すればよく、入浴後は、肌がしっとりしなめらかで、湯冷めしない高品質の浴用剤である。

#### 実施例 B-16 化粧用クリーム

- 15 モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A-8 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 2 重量部、 $\alpha$ -グルコシルルチン（株式会社林原販売、商品名  $\alpha$ Gルチン）1 重量部、流動パラフィン 1 重量部、トリオクタン酸グリセリン 10 重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これに L-乳酸 2 重量部、1,3-ブチレングリコール 5 重量部および精製水 66 重量部を加え、ホモゲナイ
- 20 ザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

- 25 実施例 B-17 練歯磨

第二リン酸カルシウム 45 重量部、ラウリル硫酸ナトリウム 1.5

重量部、グリセリン 25 重量部、ポオキシエチレンソルビタンラウレート 0.5 重量部、実施例 A-2 の方法で得た環状四糖含有シラップ 15 重量部、サッカリン 0.02 重量部および防腐剤 0.05 重量部を水 13 重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗浄力  
5 力を落とすことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

#### 実施例 B-18 流動食用固体製剤

実施例 A-6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 100 重量部、トレハロース含水結晶 200 重量部、マルトテトラオース高含有粉末 200 重量部、粉末卵黄 270 重量部、脱脂粉乳 209 重量部、  
10 塩化ナトリウム 4.4 重量部、塩化カリウム 1.8 重量部、硫酸マグネシウム 4 重量部、チアミン 0.01 重量部、L-アスコルビン酸ナトリウム 0.1 重量部、ビタミン E アセテート 0.6 重量部およびニコチン酸アミド 0.04 重量部からなる配合物を調製し、この配合物  
15 25 グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

本品は、環状四糖により難消化性の食物繊維を強化し、整腸作用に優れた流動食である。1 袋分を約 150 乃至 300 ml の水に溶解して流動食とし、経口的、または鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により  
20 より利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

#### 実施例 B-19 錠剤

アスピリン 50 重量部に実施例 A-7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 14 重量部、コーンスターチ 4 重量部を十分に混合した後、常法に従って打錠機により打錠して厚さ 5.25 mm、1 錠 6  
25 80 mg の錠剤を製造した。

本品は、環状四糖の賦形性を利用したもので、吸湿性がなく、物理的強度も充分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

#### 実施例 B-20 糖衣錠

- 5 重量 150 mg の素錠を芯剤とし、これに実施例 A-7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 40 重量部、プルラン（平均分子量 20 万）2 重量部、水 30 重量部、タルク 25 重量部および酸化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約 230 mg になるまで糖衣し、次いで、同じ環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 65 重量部、  
10 プルラン 1 重量部および水 34 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

#### 実施例 B-21 外傷治療用膏薬

- 15 実施例 A-7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 100 重量部およびマルトース 300 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 50 重量部を加え混合し、更に 10 w/v % プルラン水溶液 200 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、環状四糖によりヨウ素、メタノールの揮散を防  
20 止し、経時変化が少ない商品価値の高い膏薬である。

又、本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、マルトースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

#### 25 産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明は、新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ

糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、詳細には、新規な  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とこの酵素を製造する方法、この酵素を産生する微生物、この酵素を用いた  $\alpha$ -グルコシル転移方法、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、加えて、この酵素と  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを併用したサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖の製造方法、並びにこれら糖質を含有せしめた組成物に関する。本発明によれば、産業上有用なサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、これを含む糖質および組成物を、工業的に安価かつ大量に製造することが可能となった。斯かる環状四糖またはこれを含む糖質は、実質的に非還元性乃至低還元性で、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。本発明は斯くも顕著な作用効果を有する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 請求の範囲

1. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。
2. デキストラン生成能を有さず、EDTAによって活性が阻害される請求項1記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。
3. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質である請求の範囲第1項または第2項記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。
4. 下記の理化学的性質を有する $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。
- (1) 作用
- 20 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく $\alpha$ -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する
- 25
- (2) 分子量

S D S - ゲル電気泳動法により、約 7 4 , 0 0 0 乃至 1 6 0 , 0 0 0 ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、p I 約 3 . 8 乃至 7 . 8 の  
5 範囲内に等電点を有する。

(4) 至適温度

p H 6 . 0 、 6 0 分間反応で、約 4 0 乃至 5 0 °C の範囲内に至適温度を有する。

p H 6 . 0 、 6 0 分間反応で、1 m M C a <sup>2+</sup> 存在下、約 4 5 乃至 5  
10 5 °C の範囲内に至適温度を有する。

p H 8 . 4 、 6 0 分間反応で、6 0 °C に至適温度を有する。または、  
p H 8 . 4 、 6 0 分間反応で 1 m M C a <sup>2+</sup> 存在下、6 5 °C に至適温度を有する。

(5) 至適 p H

15 3 5 °C 、 6 0 分間反応で、p H 約 6 . 0 乃至 8 . 4 の範囲内に至適 p H を有する。

(6) 温度安定性

p H 6 . 0 、 6 0 分間保持する条件で、約 4 5 °C 以下に温度安定域を有する。

20 p H 6 . 0 、 6 0 分間保持する条件で、1 m M C a <sup>2+</sup> 存在下、約 5 0 °C 以下に温度安定域を有する。

p H 8 . 0 、 6 0 分間保持する条件で、約 5 5 °C 以下に温度安定域を有する。または、

p H 8 . 0 、 6 0 分間保持する条件で、1 m M C a <sup>2+</sup> 存在下、約 6  
25 0 °C 以下に温度安定域を有する。

(7) p H 安定性

4℃、24時間保持する条件で、pH約4.5乃至10.0の範囲内に安定pH域を有する。

5. 配列表における配列番号1、配列番号5乃至7、配列番号11乃至14、および配列番号18に示すアミノ酸配列から選ばれる1種  
5 または2種以上の配列を有する、請求の範囲1乃至4のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

6.  $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Mn}^{2+}$ でその活性が安定化および／または賦活化される請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

10 7.  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が、精製酵素または粗酵素であることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

8. 請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有する微生物を栄養培地で培養して得られる培養物から、請求の範囲第1乃至7のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を採取することを特徴とする $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。  
15

9. 微生物が、バチルス属またはアルスロバクター属の微生物である、請求の範囲第8記載の $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。  
20

10. バチルス属の微生物が、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9 (FERM BP-7143)、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11 (FERM BP-7144)、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) N75 (FERM BP-7591)、またはそれらの変異株である請求の  
25



範囲第 9 項記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。

11. アルスロバクター属の微生物が、アルスロバクター グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) A19 (FERM BP-7590)、またはその変異株である請求の

5 範囲第 9 記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。

12. 非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させて、 $\alpha$ -グルコシル転移反応させることを特徴と

10 する  $\alpha$ -グルコシル転移反応方法。

13. 請求の範囲第 12 項記載の  $\alpha$ -グルコシル転移反応に際し、D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-フコース、D-プシコース、L-ソルボース、メチルー  $\alpha$ -グルコース、  
15 メチルー  $\beta$ -グルコース、N-アセチルグルコサミン、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、グリセロール、マルチトール、ラクトース、スクロース、および L-アスコルビン酸から選ばれる 1 種または 2 種以上の受容体共存下で反応させて糖転移物を生成させることを特徴とする請求の範囲第

20 12 記載の  $\alpha$ -グルコシル転移反応方法。

14. 非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させて、 $\alpha$ -グルコシル転移反応させ、 $\alpha$ -イソマル

25 トシルグルコ糖質を生成させることを特徴とする  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法。

1 5. 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1, 4$  グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる 1 種または 2 種以上の糖質である請求の範囲第 1 4 項記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法。

1 6. 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1, 4$  グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該酵素の作用により生成する  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の  $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断して、この  $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移する  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させて得られるサイクロ  $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシルー  $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー  $(1 \rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー  $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー  $(1 \rightarrow \}$  の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

1 7. 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1, 4$  グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる 1 種または 2 種以上の糖質である請求の範囲第 1 6 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

1 8. 非還元末端の結合様式として  $\alpha-1, 4$  グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該酵素を作用させて生成する  $\alpha$ -イソマルトシルグル

コ糖質の  $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断して、この  $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移する  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させて得られるサイクロ  $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖とともに他の糖質を含有する溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけて、得られるサイクロ  $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

19. 環状四糖、またはこれを含む糖質が、サイクロ  $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を、固形物当り 30 w/w% 以上含有していることを特徴とする請求の範囲第 16 項乃至第 18 項のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

20. サイクロ  $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質が、シラップ、マスキット、非晶質粉末、非晶質固状物、結晶粉末、または結晶固状物の形態にあることを特徴とする請求の範囲第 16 項乃至第 19 項のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

21. 結晶が、サイクロ  $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコ

ピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → } の構造を有する環状四糖 5 乃至 6 含水結晶、サイクロ {→ 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → } の構造を有する環状四糖 1 含水結晶、およびサイクロ {→ 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → } の構造を有する環状四糖無水結晶から選ばれる 1 種または 2 種以上であることを特徴とする請求の範囲第 20 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

22. 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたものであることを特徴とする請求の範囲第 20 項または第 21 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

23. 環状四糖を含む糖質が、サイクロ {→ 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 6) - α-D-グルコピラノシルー (1 → 3) - α-D-グルコピラノシルー (1 → } の構造を有する環状四糖とともに、グルコース、マルトース、および非還元末端の結合様式として α-1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質から選ばれる 1 種または 2 種以上の糖質を含む糖質である請求の範囲第 16 項乃至第 22 項のいずれか記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

24. 非還元末端の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有せしめた栄養培地に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能と、当該酵素を作用させて生成する α-イソ

マルトシルグルコ糖質の  $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断して、この  $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移する  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能とを有する微生物を培養して得られる、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)  
 5 ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

25. 非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデ  
 10 キストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質である請求の範囲第24項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

26. 微生物が、バチルス属またはアルスロバクター属の微生物である請求の範囲第24項または第25項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

27. バチルス属に属する微生物が、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9 (FERM BP-7143)、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11 (FERM BP-7144)、バチルス  
 20 グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) N75 (FERM BP-7591)、またはそれらの変異株である請求の範囲第26項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

28. アルスロバクター属の微生物が、アルスロバクター グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) A1  
 25 9 (FERM BP-7590)、またはその変異株である請求の範

図第 26 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

29. 培養物またはこれから得られる糖質に、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼから選ばれる 1 種または 2 種以上の酵素を作用させた後、脱色、脱塩、カラム  
5 クロマトグラフィーによる分画、膜による分離、微生物による醗酵処理およびアルカリ処理による分解除去方法から選ばれる 1 種または 2 種以上の精製方法を用いて得られる、請求の範囲第 24 項乃至第 28 項のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

30.  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素が、下記の理化学的性質を有する酵素であることを特徴とする請求の範囲第 16 項、第 18 項または  
10 第 24 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

(1) 作用

非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結  
15 合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を生成する。

20 (2) 分子量

S D S-ゲル電気泳動法により、約 82, 000 ダルトン乃至約 136, 000 ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、p I 約 3.7 乃至  
25 p I 約 8.3 の範囲内に等電点を有する。

(4) 至適温度

p H 6. 0、3 0 分間反応の条件下において、約 4 5 °C 乃至約 5 0 °C の範囲内に至適温度を有する。

( 5 ) 至適 p H

3 5 °C、3 0 分間反応の条件下において、p H 約 5. 5 乃至 p H 約 6. 5 の範囲内に至適 p H を有する。

( 6 ) 温度安定性

p H 6. 0、6 0 分間保持する条件で、約 4 5 °C 以下に温度安定域を有する。

( 7 ) p H 安定性

4 °C、2 4 時間保持する条件で、p H 約 3. 6 乃至約 p H 1 0. 0 の範囲内に安定 p H 域を有する。

3 1. 澱粉を糊化および／または液化した溶液に、請求の範囲第 1 項乃至第 7 項のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該酵素を作用させて生成する  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質の  $\alpha$ -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断して、この  $\alpha$ -イソマルトシル部分を転移する  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とを作用させることを特徴とする、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

3 2. 澱粉を糊化および／または液化した溶液が、DE 2 0 以下の溶液である請求の範囲第 3 1 項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

3 3. 澱粉を糊化および／または液化した溶液に、請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および  $\alpha$

- ーイソマルトシル転移酵素とともにシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させ、必要に応じて、更に $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼから選ばれる1種または2種以上の酵素を作用させることを特徴とする
- 5 請求の範囲第31項または第32項記載のサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。
- 10 34. 更に、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィーによる分画、膜による分離、微生物による醗酵処理およびアルカリ処理による分解除去から選ばれる1種または2種以上の精製方法を用いることを特徴とする請求の範囲第31項乃至第33項のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。
- 15 35. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を、固形物当り30w/w%以上含有している請求の範囲第31項乃至第34項のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。
- 20 36. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ 3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質が、シラップ、マスキット、非晶質粉末、非晶質固状物、結晶粉末、または結晶固状物の形態にある請求の範囲第31項乃至第35項のいずれかに記載の環状四糖、または



これを含む糖質の製造方法。

37. 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたものである請求の範囲第36項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

- 5 38.  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素が、下記の理化学的性質を有する酵素であることを特徴とする請求の範囲第31項又は第33項記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

(1) 作用

- 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を  
10 有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー ( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー ( $1 \rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー ( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (  
15  $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を生成する。

(2) 分子量

S D S-ゲル電気泳動法により、約82,000ダルトン乃至約136,000ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

- 20 アンフォライン含有電気泳動法により、p I 約3.7乃至p I 約8.3の範囲内に等電点を有する。

(4) 至適温度

p H 6.0、30分間反応の条件下において、約45℃乃至約50℃の範囲内に至適温度を有する。

- 25 (5) 至適 p H

35℃、30分間反応の条件下において、p H 約5.5乃

至 pH 約 6.5 の範囲内に至適 pH を有する。

(6) 温度安定性

pH 6.0、60 分間保持する条件で、約 45℃ 以下に温度安定域を有する。

5 (7) pH 安定性

4℃、24 時間保持する条件で、pH 約 3.6 乃至約 pH 10.0 の範囲内に安定 pH 域を有する。

39. 請求の範囲第 16 項乃至第 30 項のいずれかに記載のサイクロ {→6) - α-D-グルコピラノシルー (1→3) - α-D-グル  
10 コピラノシルー (1→6) - α-D-グルコピラノシルー (1→3) - α-D-グルコピラノシルー (1→} の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質を含有せしめた組成物。

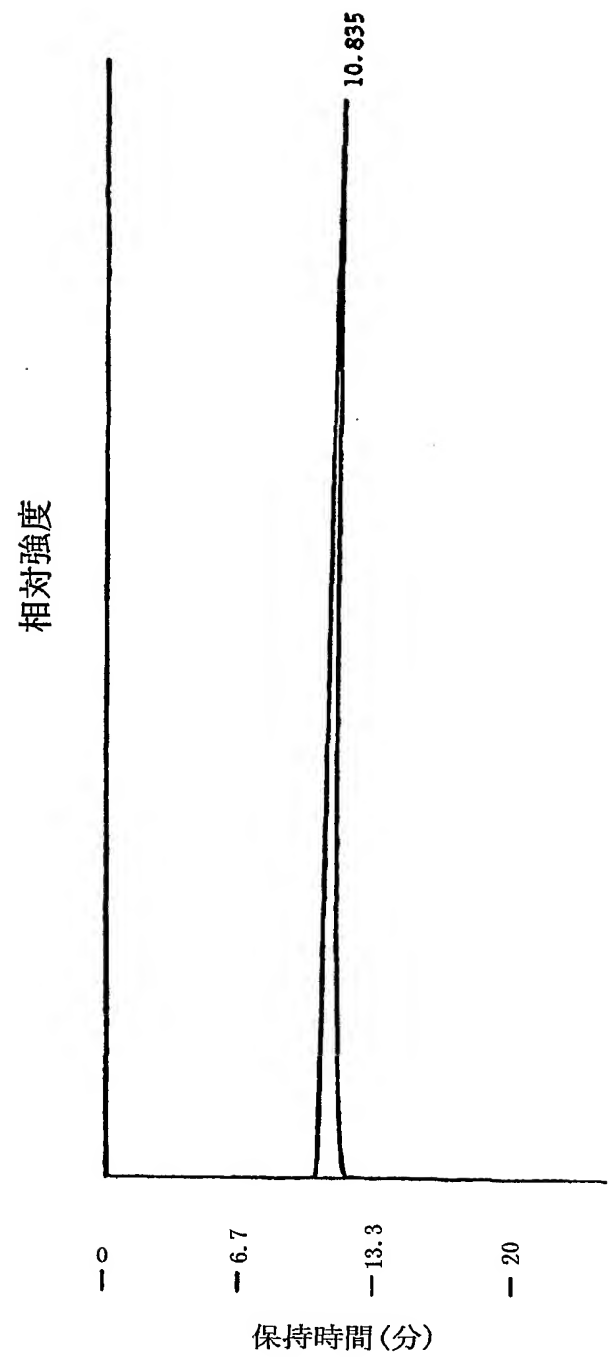
40. サイクロ {→6) - α-D-グルコピラノシルー (1→3) - α-D-グルコピラノシルー (1→6) - α-D-グルコピラノシ  
15 ルー (1→3) - α-D-グルコピラノシルー (1→} の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質を、甘味性、難醗酵性、低う蝕性、低カロリー性、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、離水防止性、固結防止性、包接性、保香性、安定性、他の糖の晶出防止性、澱粉老化防止性、蛋白質変性防止性、脂質劣化防止性、耐酸性、  
20 耐熱性、およびアミノカルボニル反応を起こしにくい特性を有する糖質として、更に、甘味料、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、保香剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、および粉末化基材としての使用目的から選ばれる 1 種または 2 種以上の使用目的で含有させた請求の範囲第  
25 39 項記載の組成物。

41. 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求の範囲第 3

9 項または第 40 項記載の組成物。

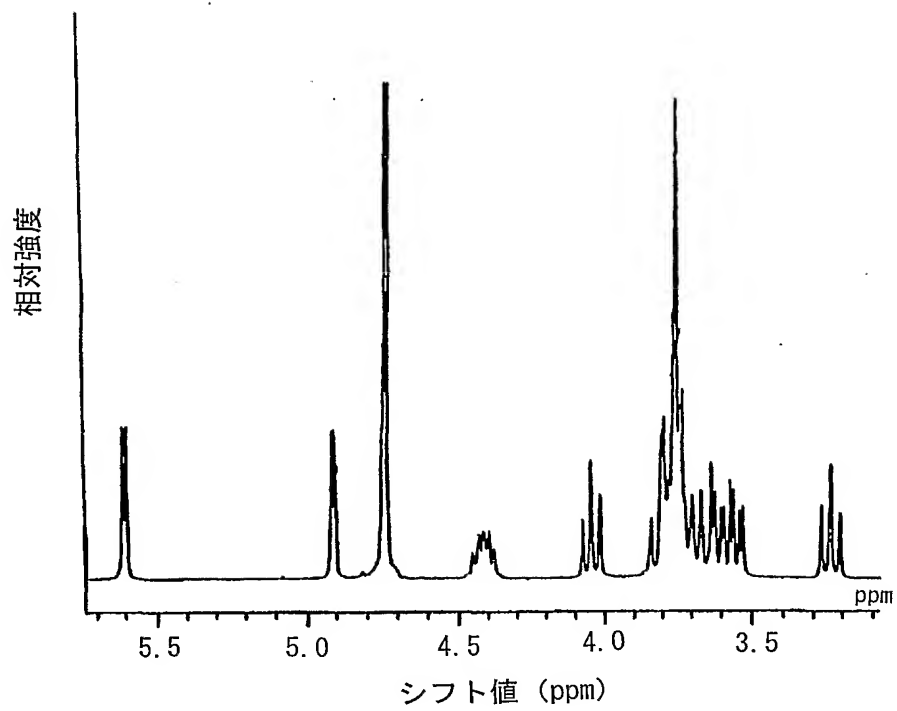
42. サイクロ  $\{\rightarrow 6\}$  -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1  $\rightarrow$  6) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1  $\rightarrow$  3) -  $\alpha$ -D-グルコピラノシルー (1  $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を固形物当り 0.1 w/w % 以上含有せしめた請求の範囲第 39 項乃至第 41 項のいずれかに記載の組成物。

第 1 図

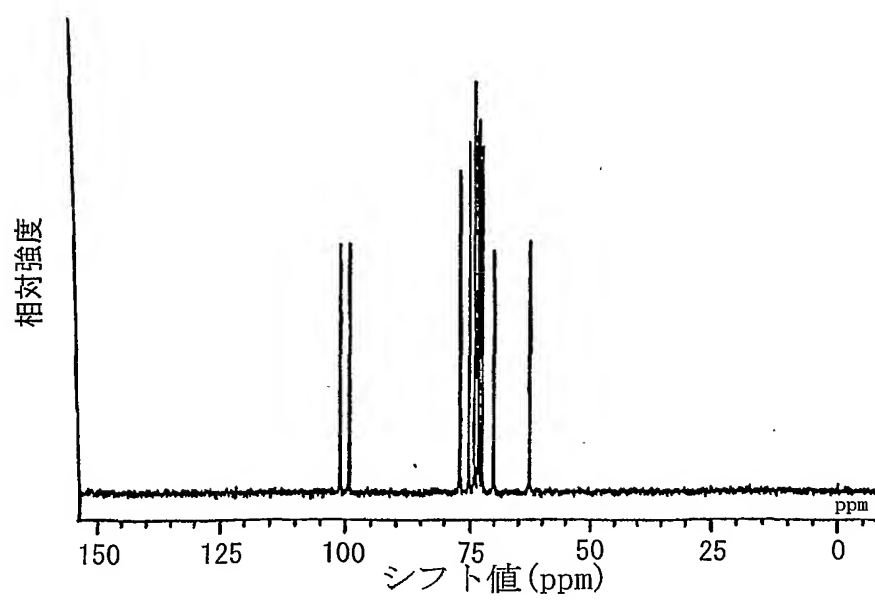


2/33

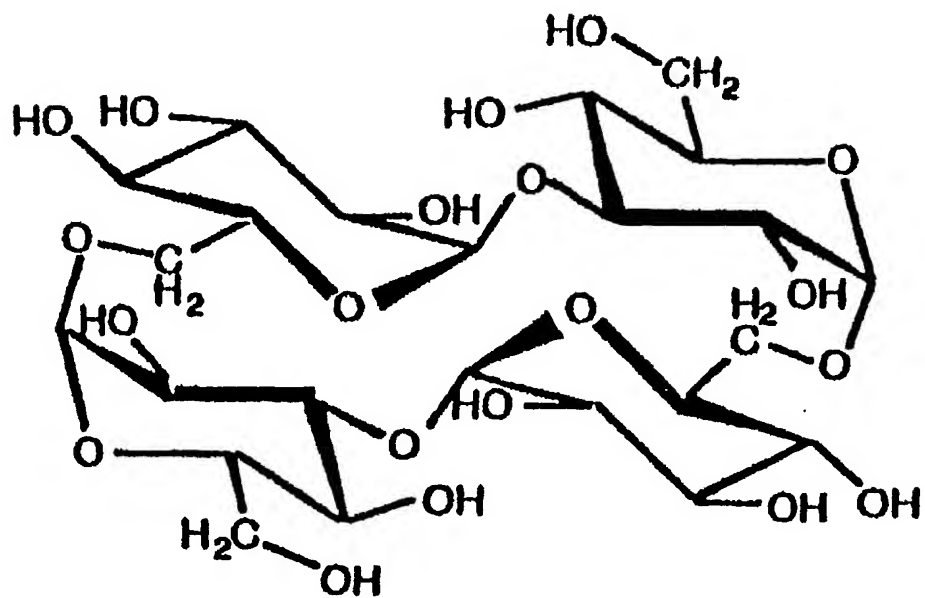
第 2 図



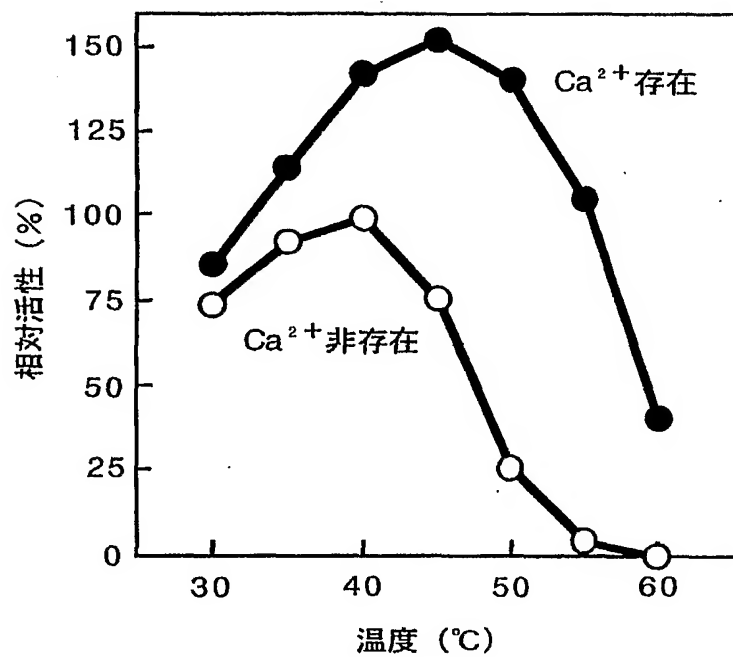
第 3 図



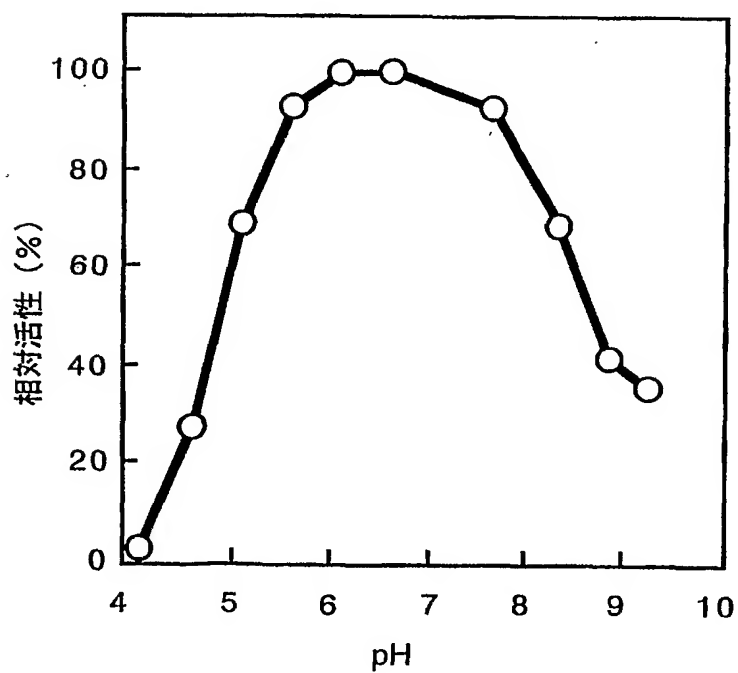
第 4 図



第 5 図

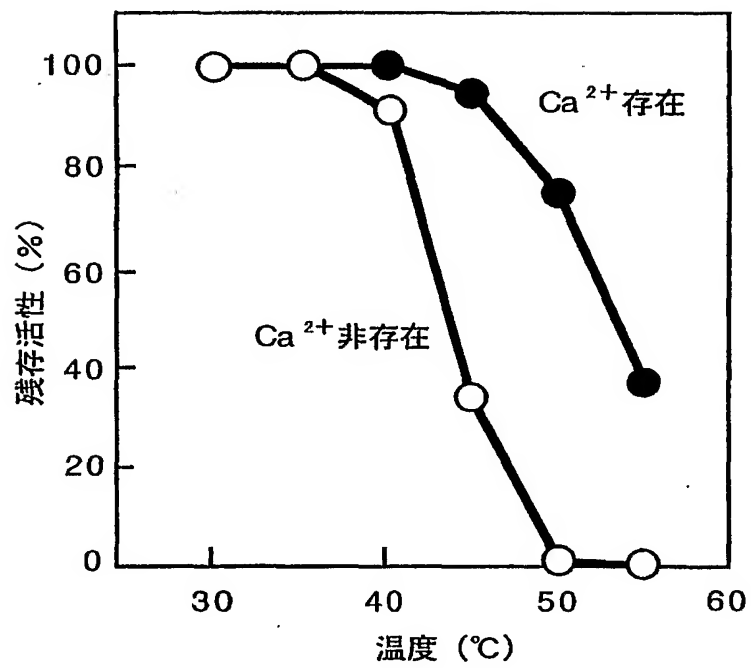


第 6 図

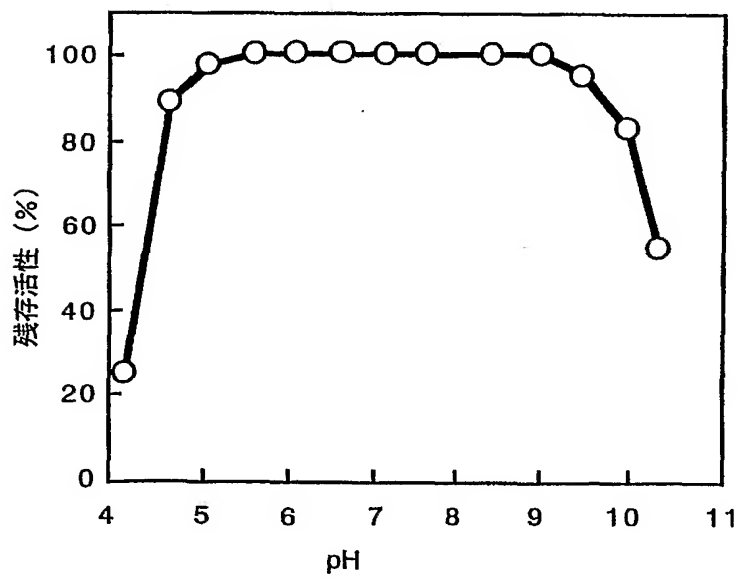


5/33

第7図

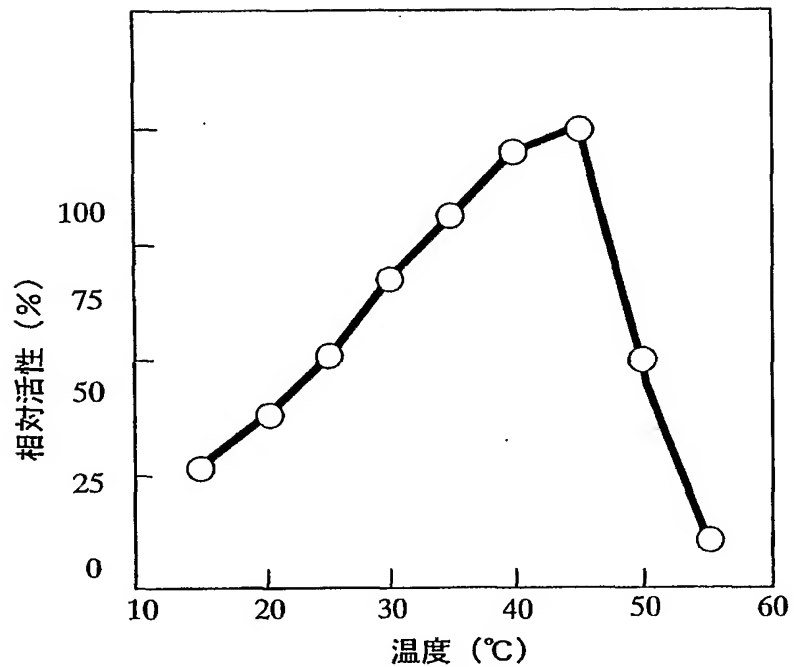


第8図

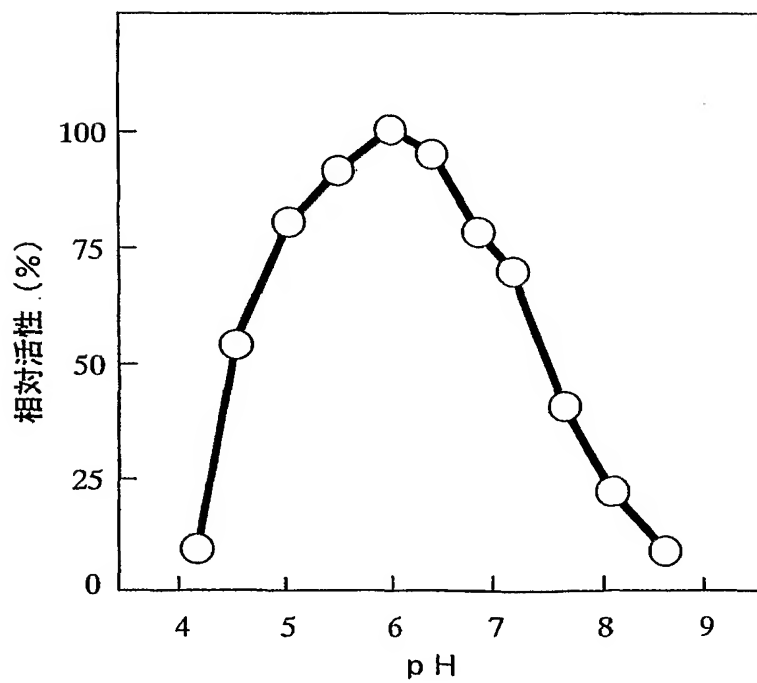




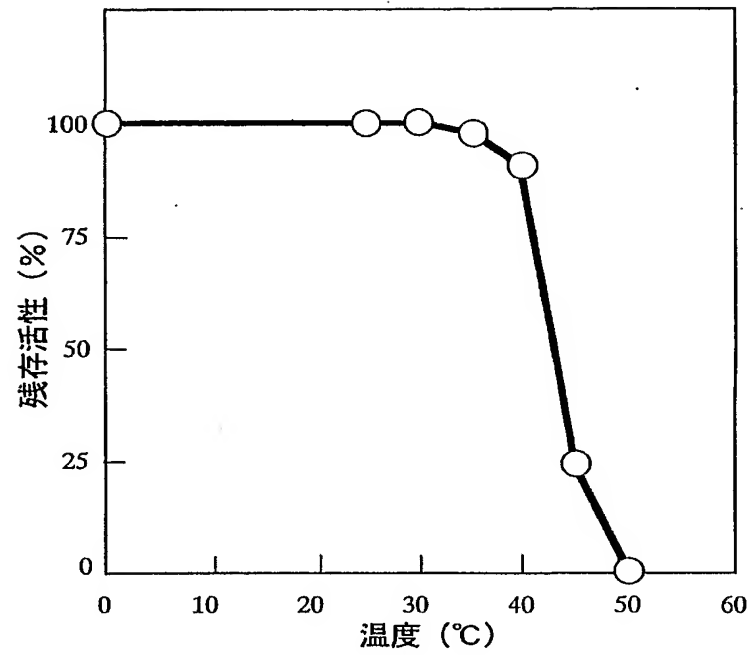
第 9 図



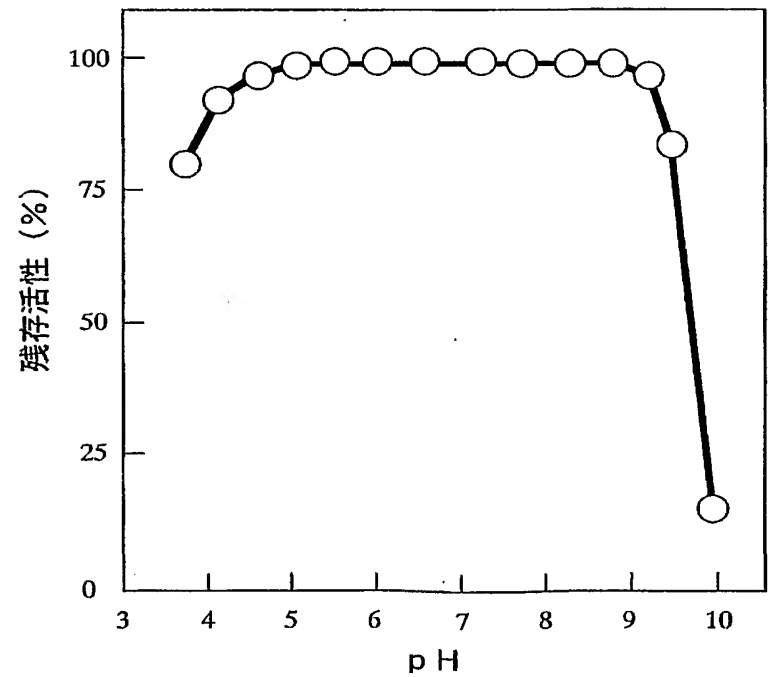
第 10 図



第 1 1 図

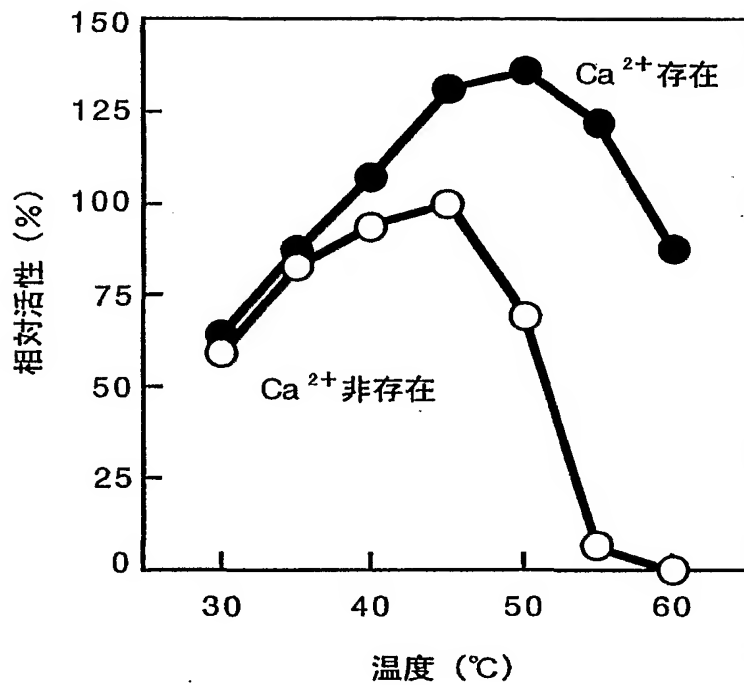


第 1 2 図

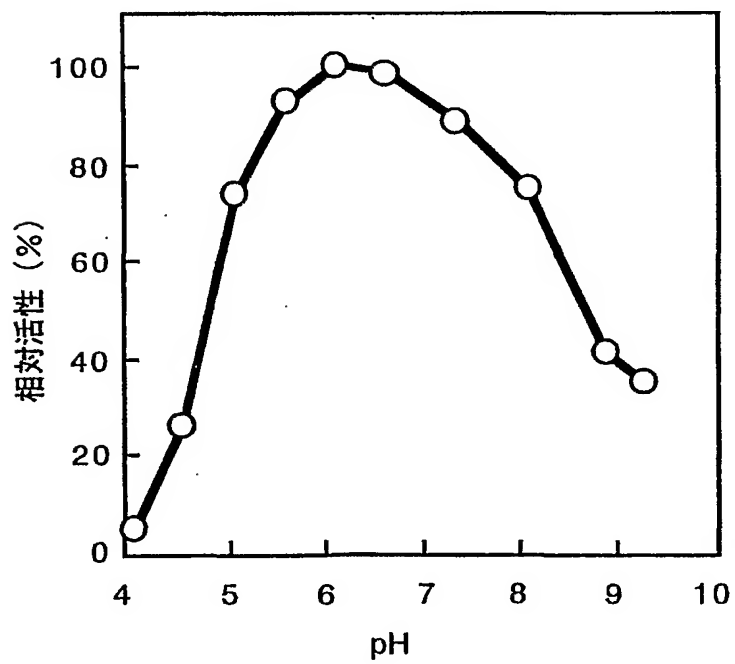


8/33

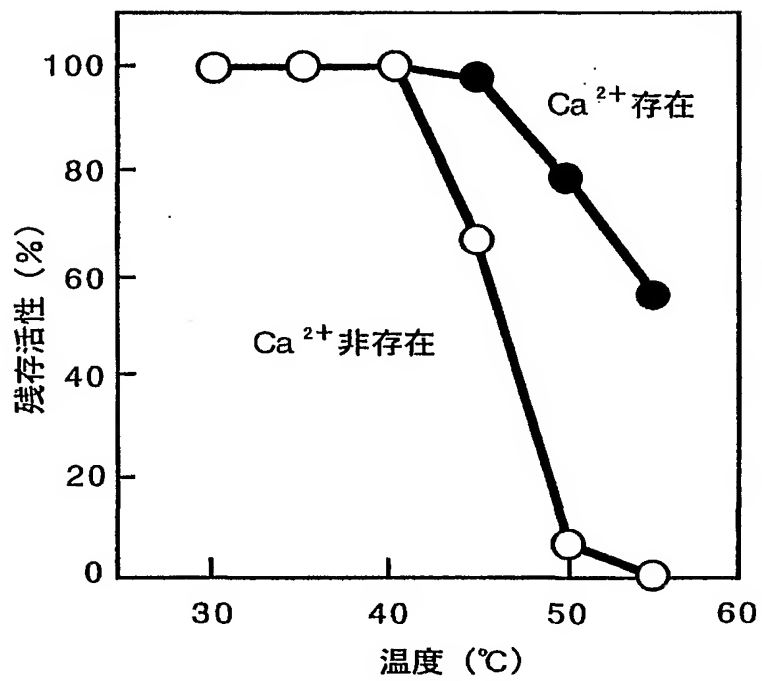
第 1 3 图



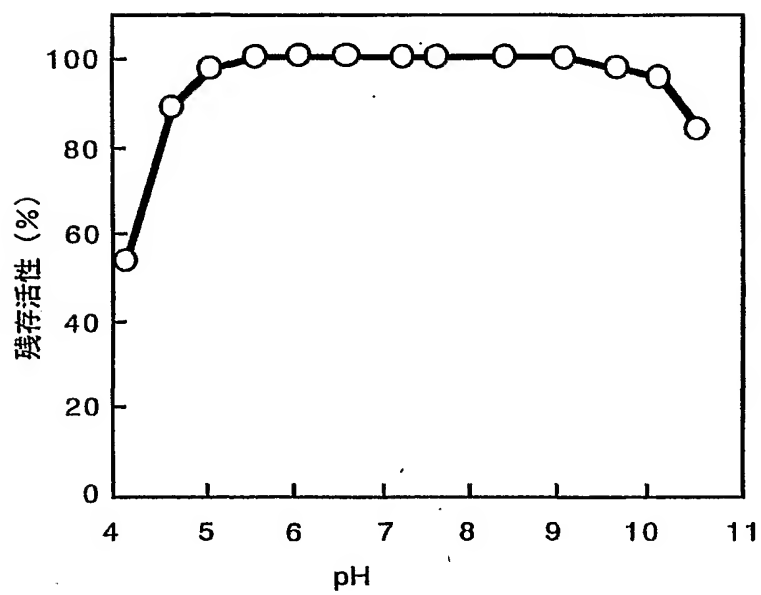
第 1 4 图



第 1 5 図

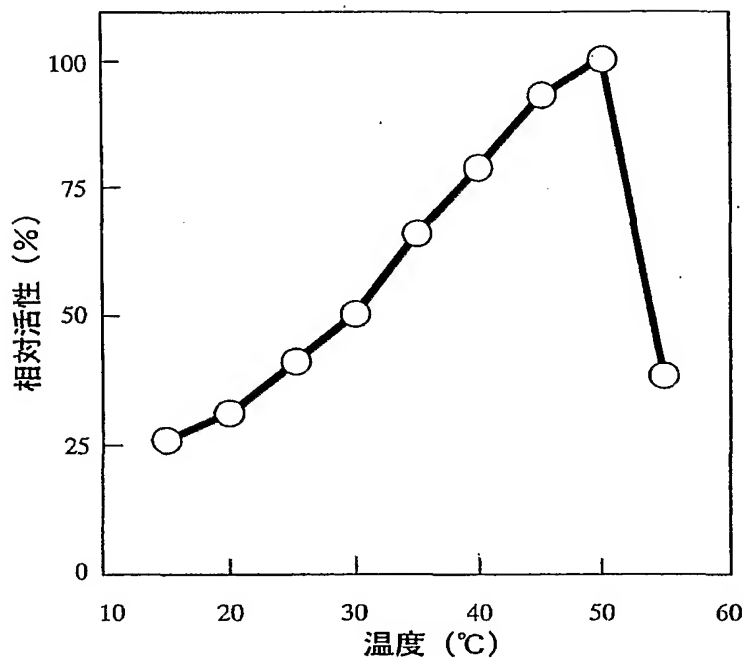


第 1 6 図

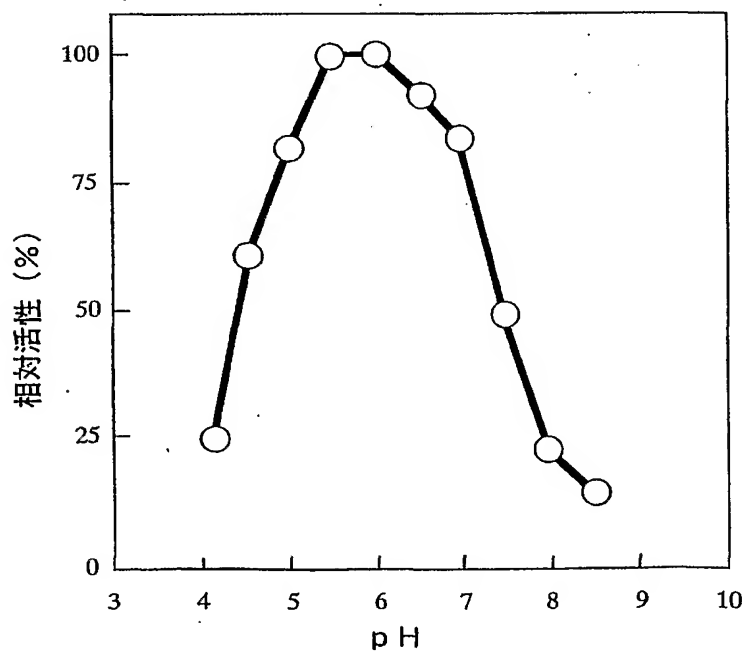


10/33

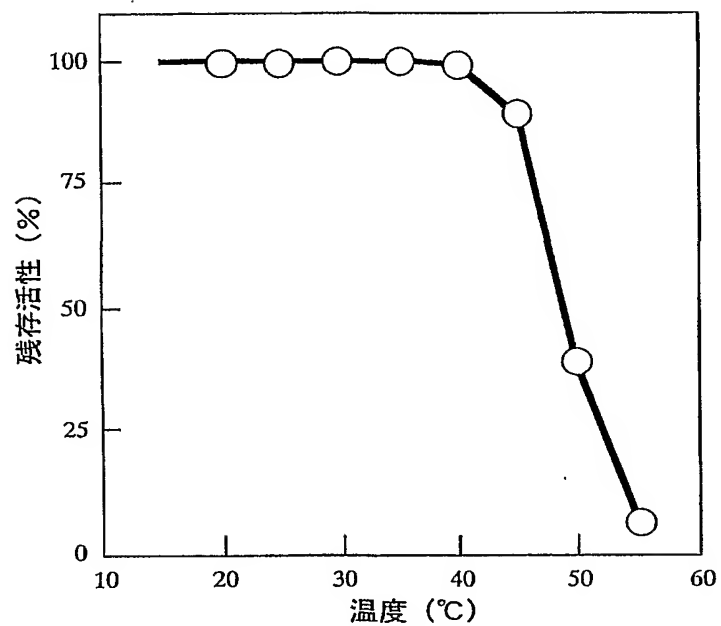
第 1 7 図



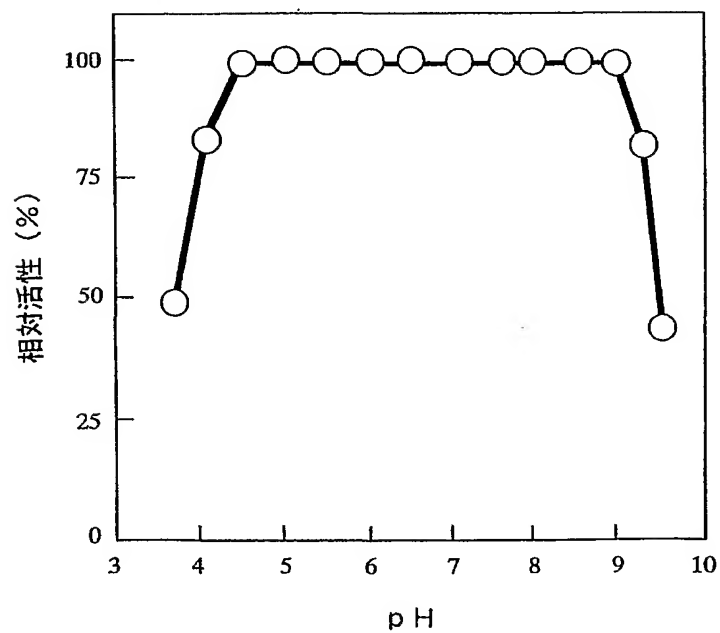
第 1 8 図



第 19 図

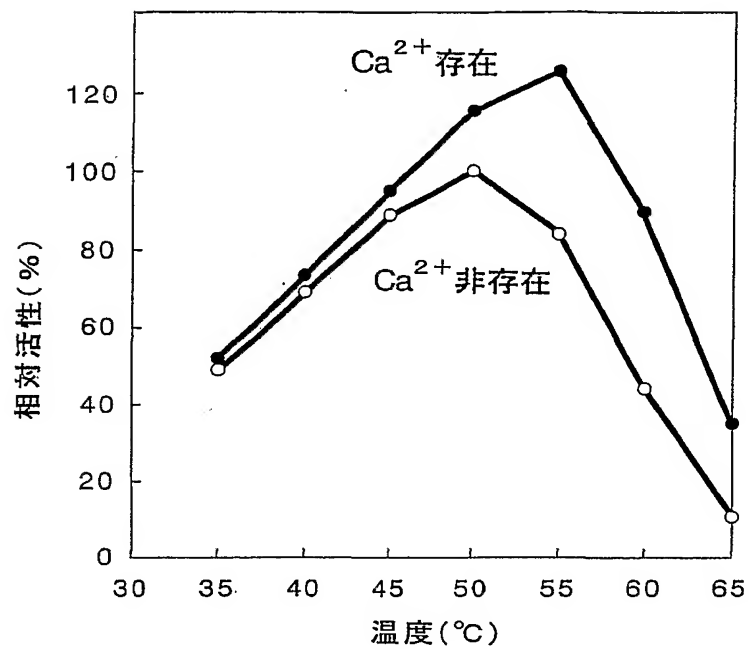


第 20 図

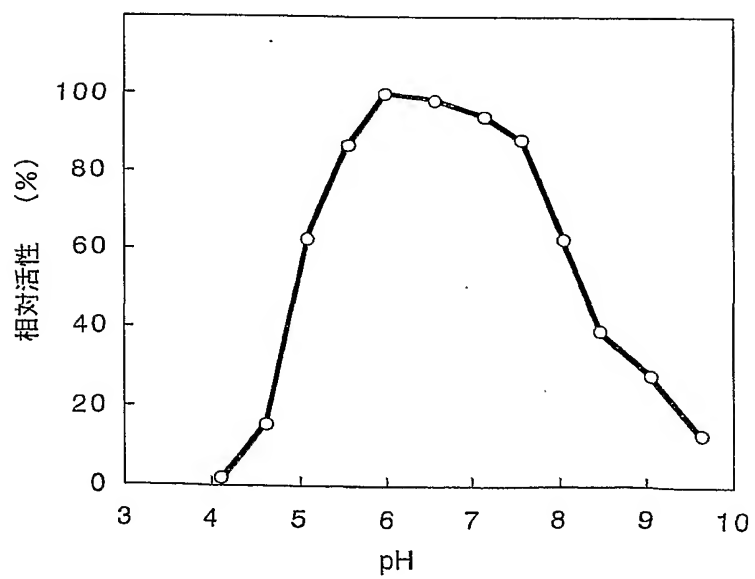


12/33

第 2 1 図

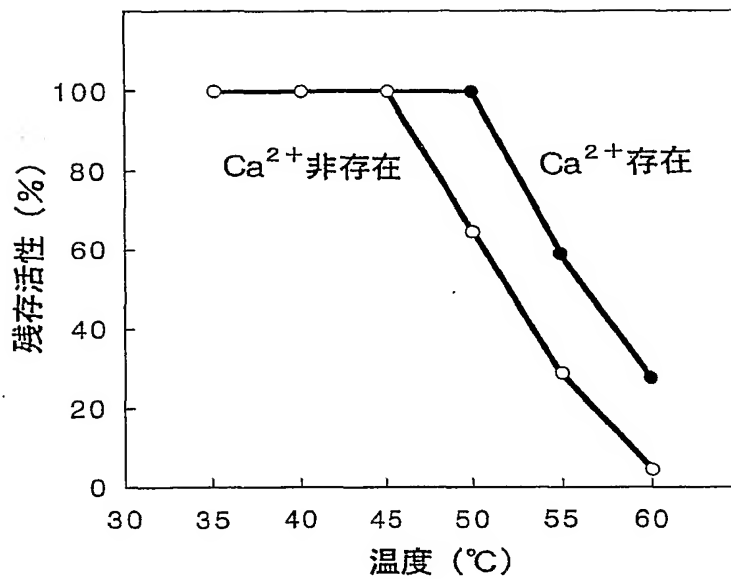


第 2 2 図

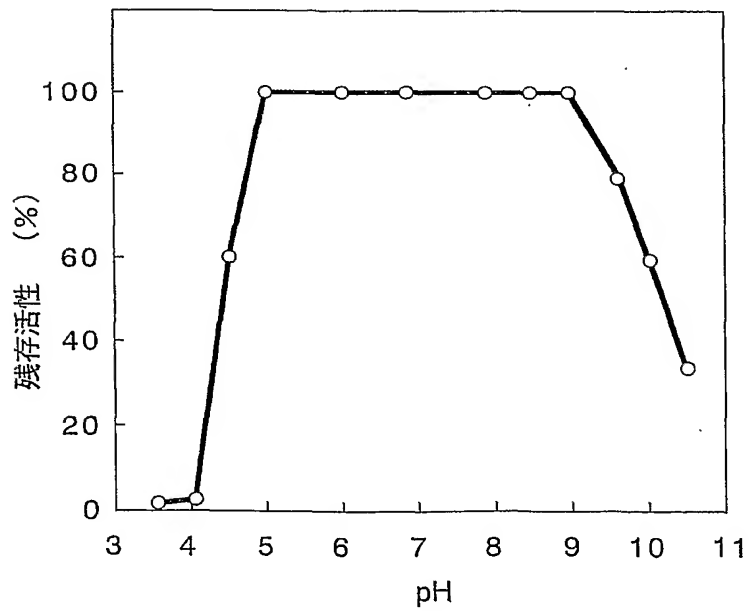


差替え用紙(規則26)

第 2 3 図



第 2 4 図

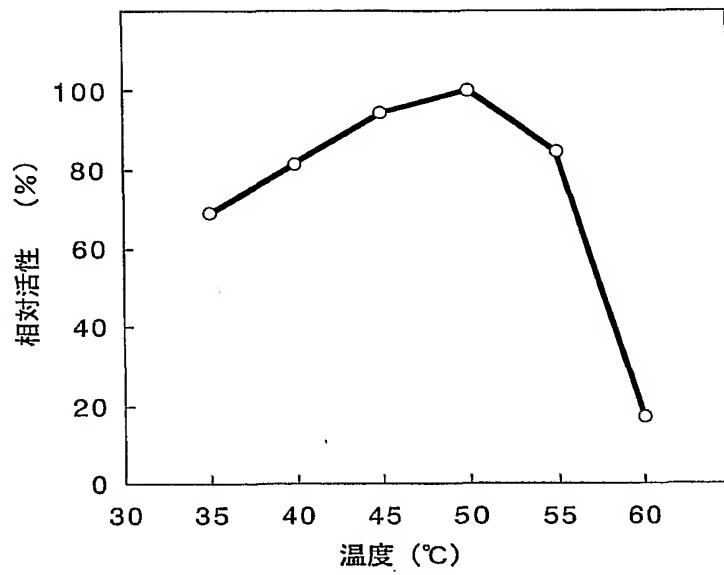


差替え用紙 (規則26)

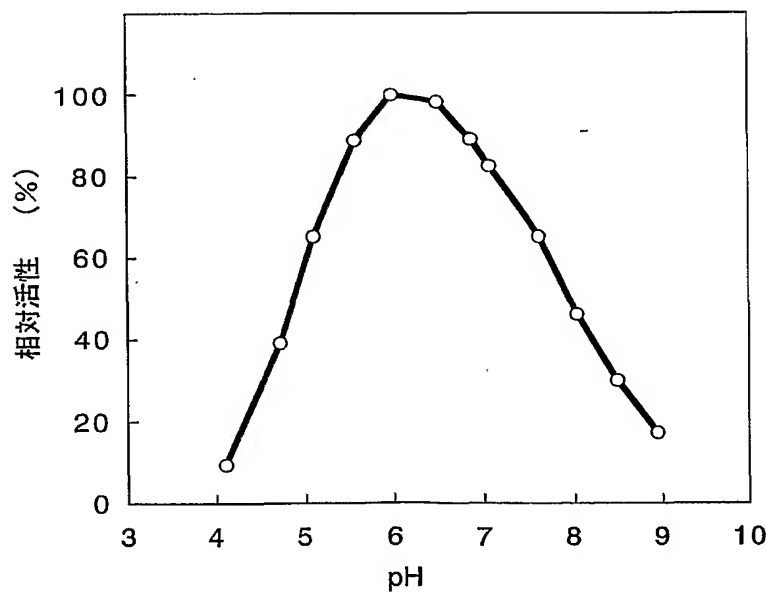


14 / 33

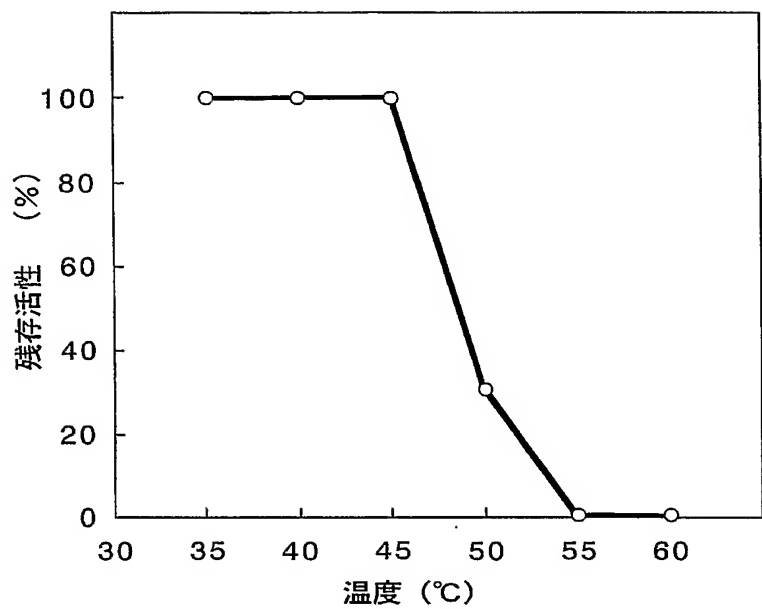
第 2 5 図



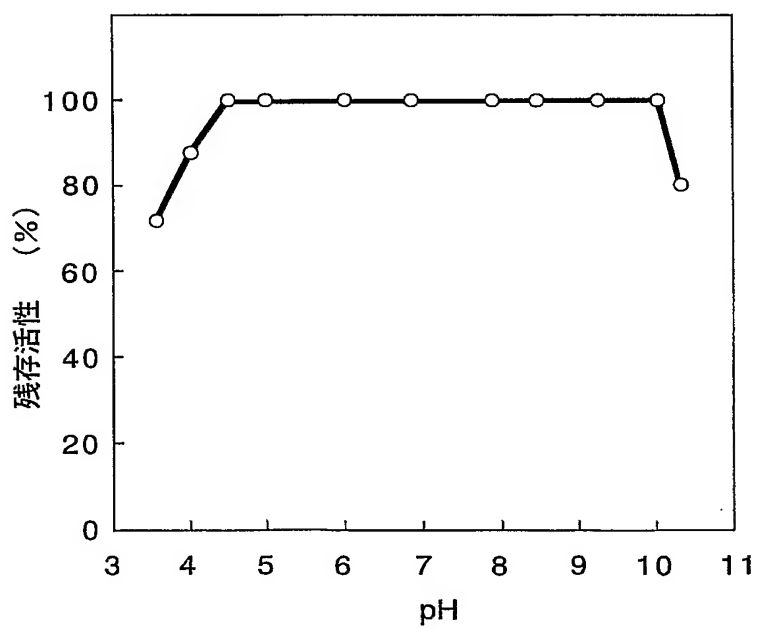
第 2 6 図



第 2 7 図

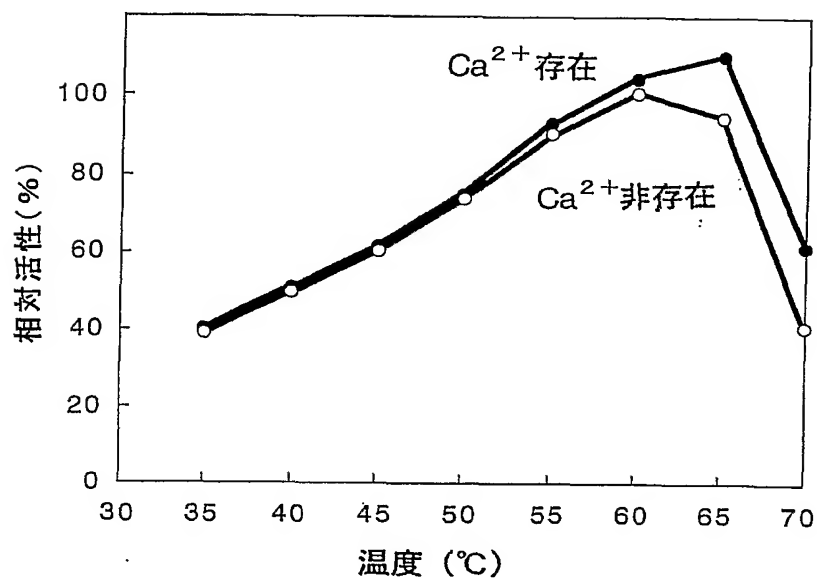


第 2 8 図

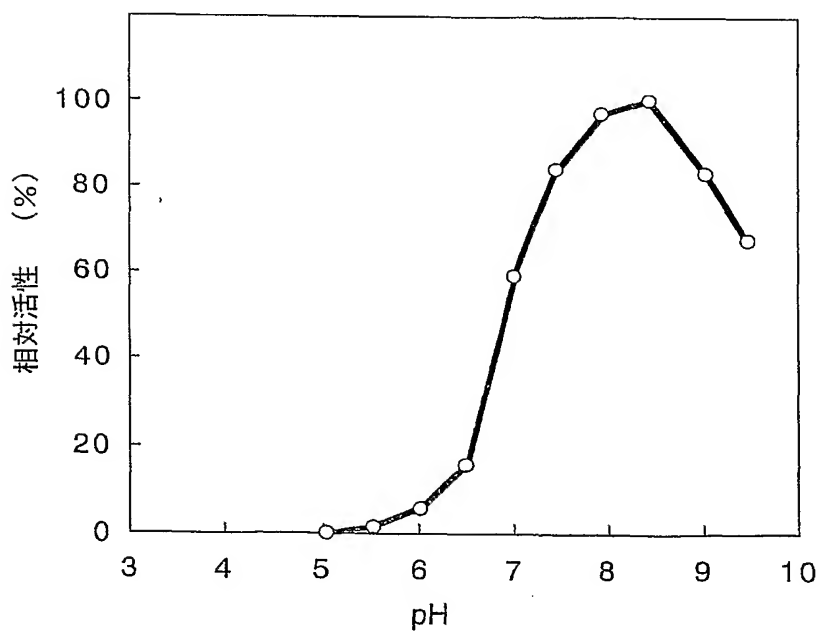


16/33

第 29 図



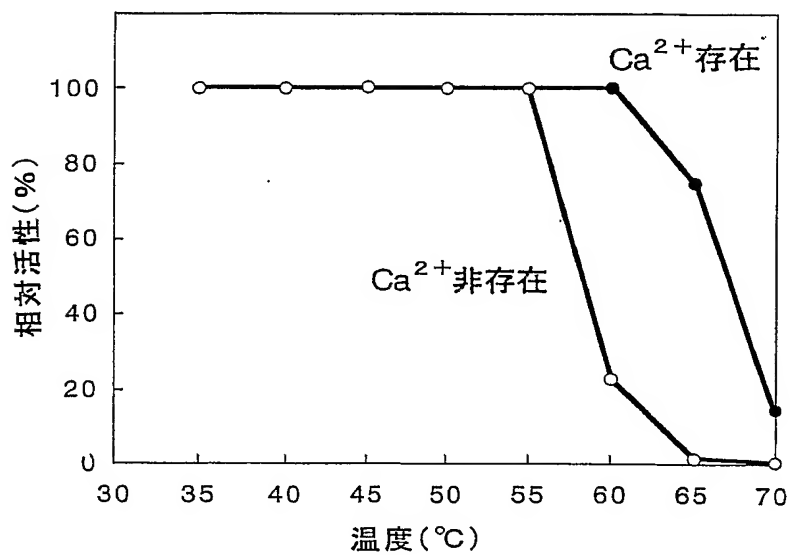
第 30 図



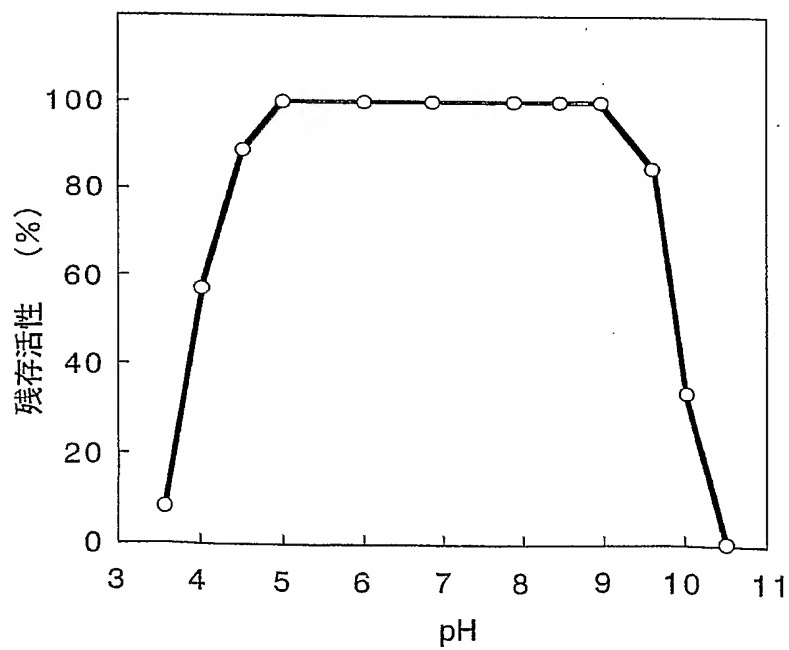
差替え用紙 (規則26)

17/33

第 3 1 図



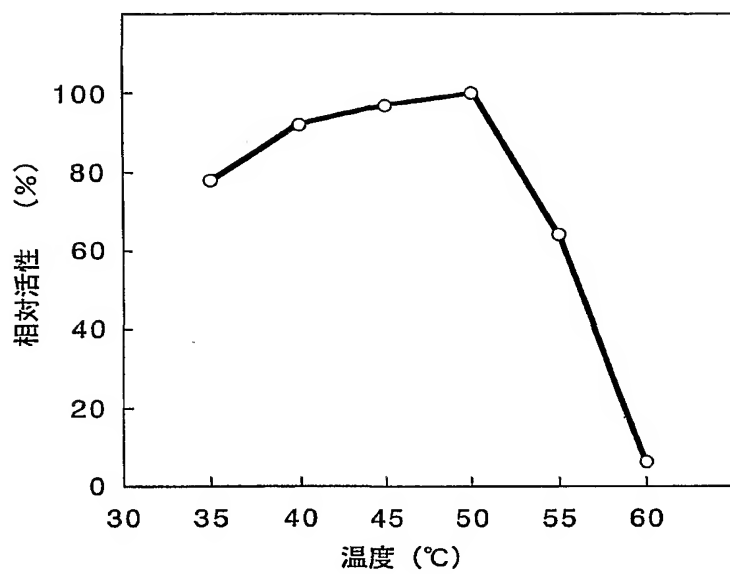
第 3 2 図



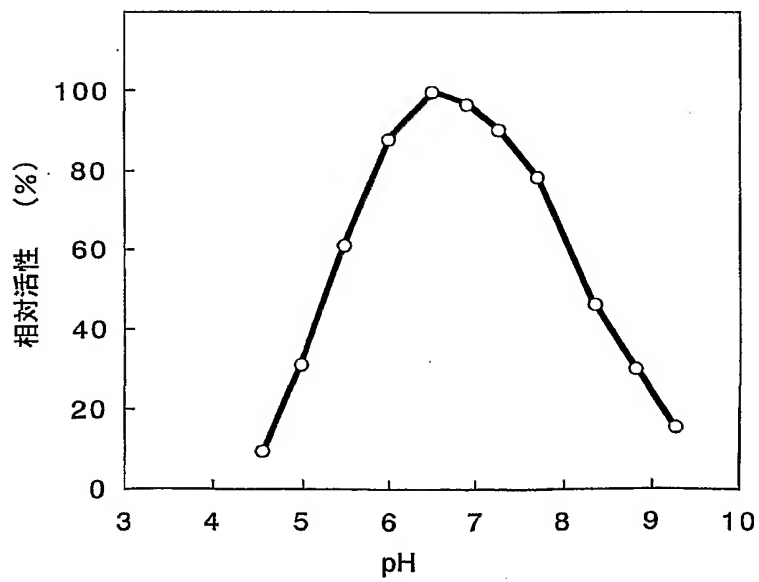
差替え用紙(規則26)

18 / 33

第 3 3 図

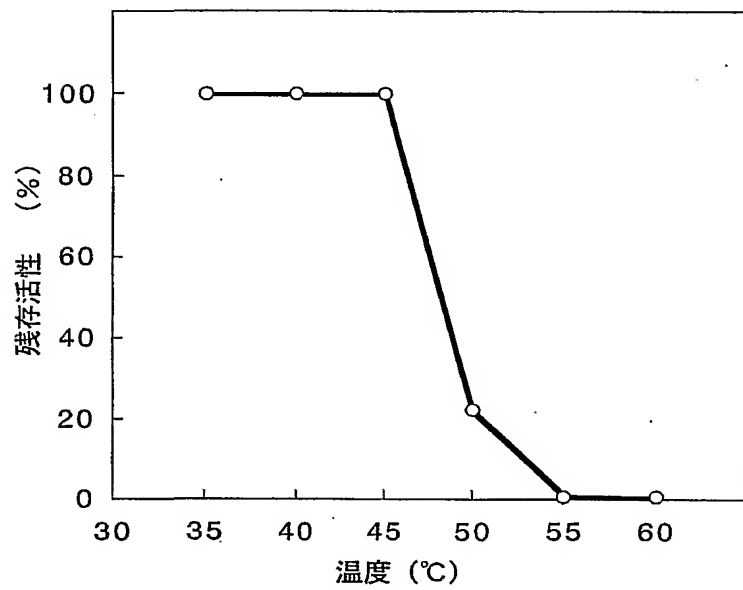


第 3 4 図

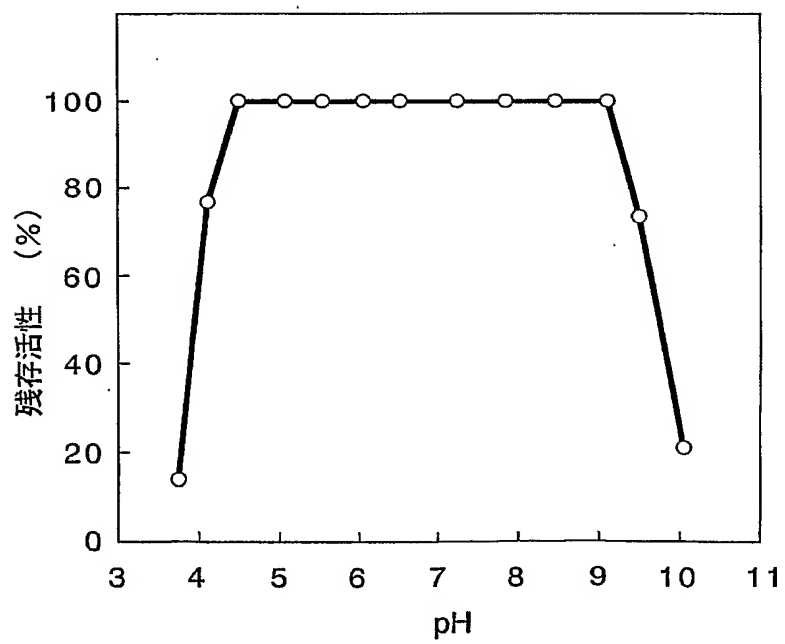


19/33

第 3 5 図

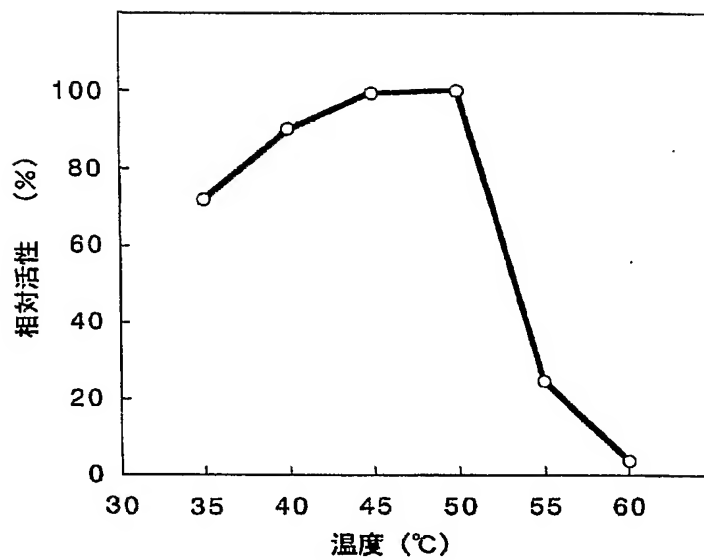


第 3 6 図

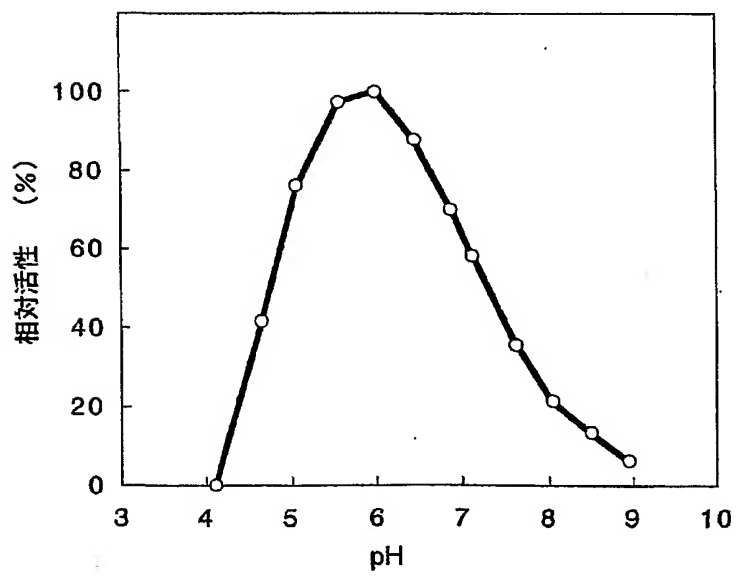


20/33

第 3 7 図

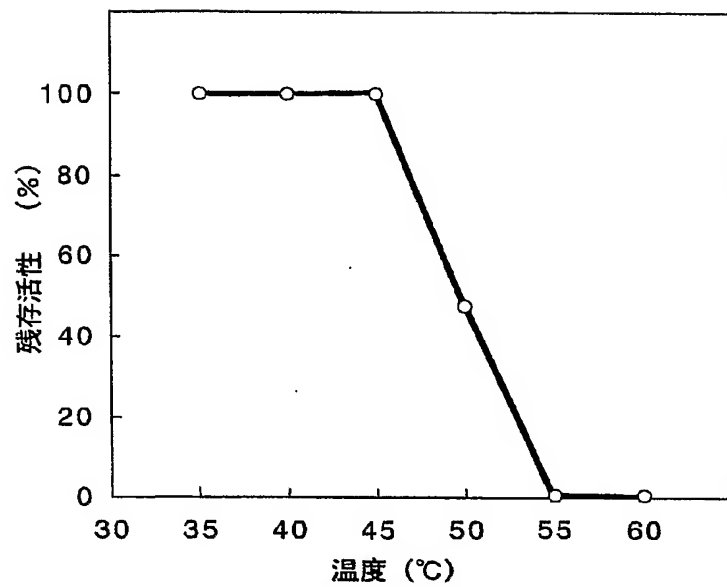


第 3 8 図

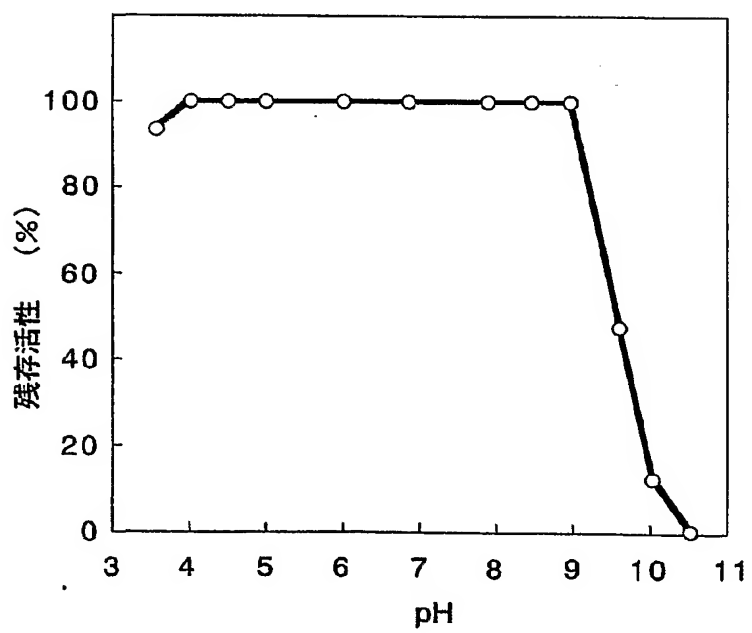


21 / 33

第 3 9 図

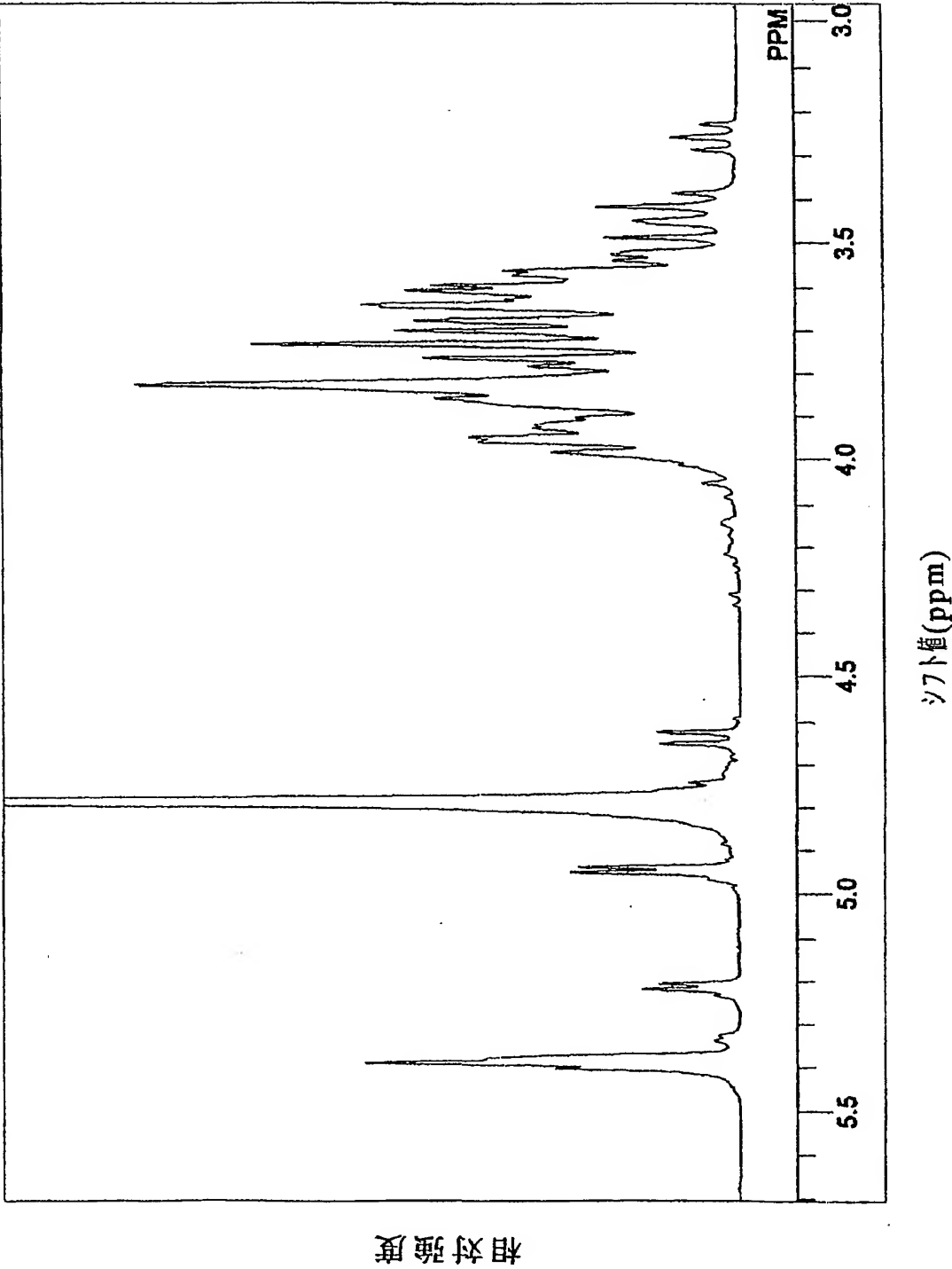


第 4 0 図

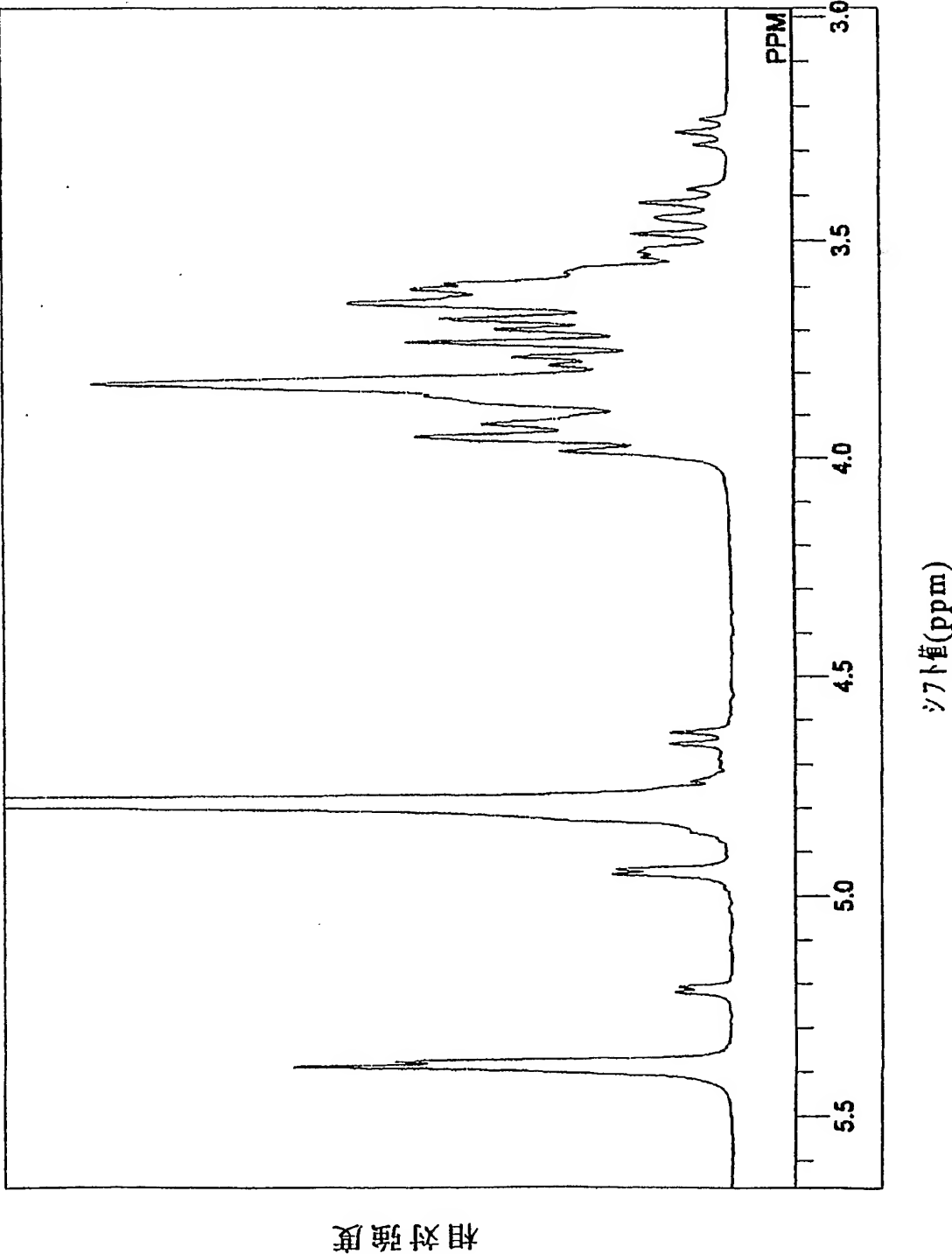




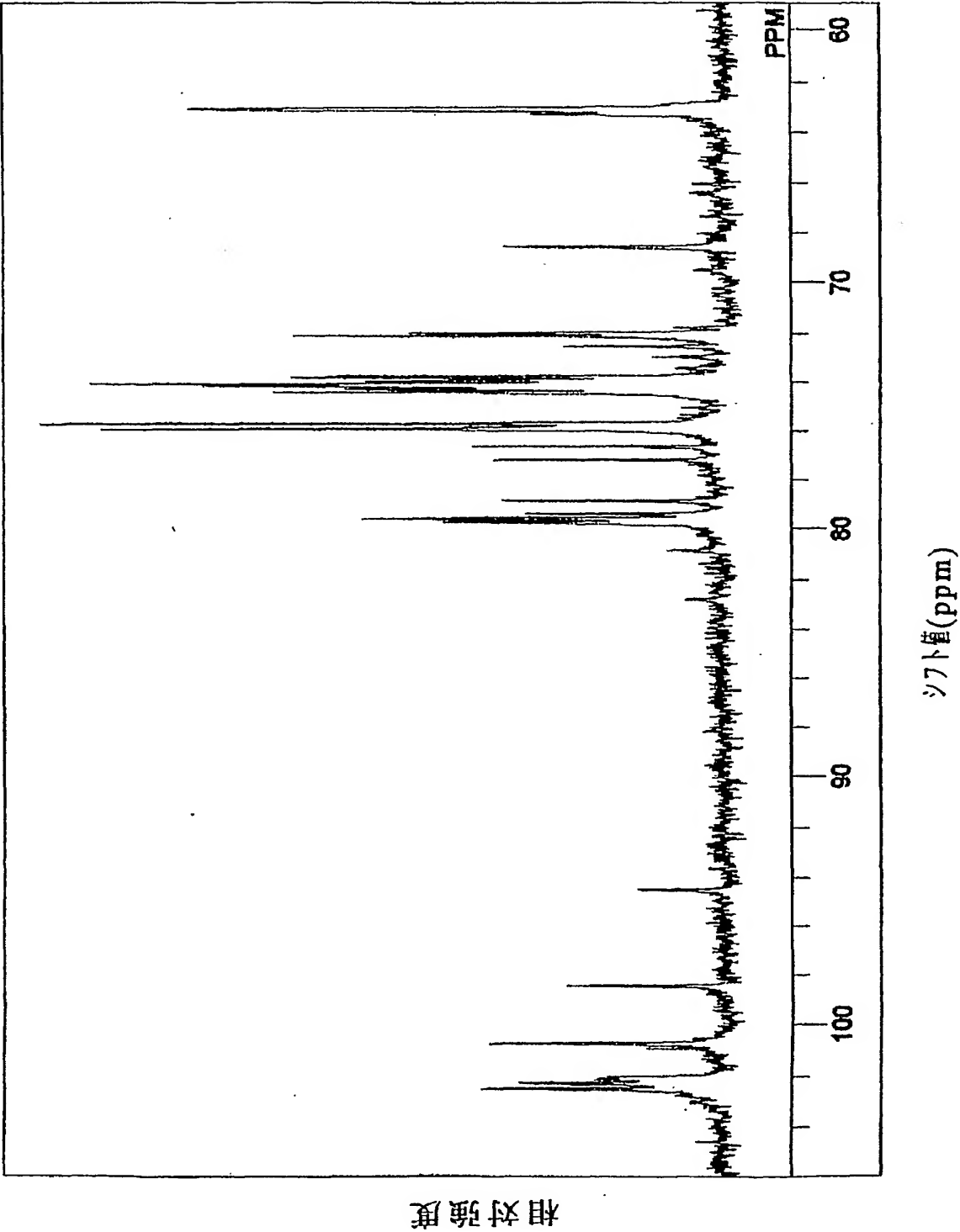
第 4 1 図



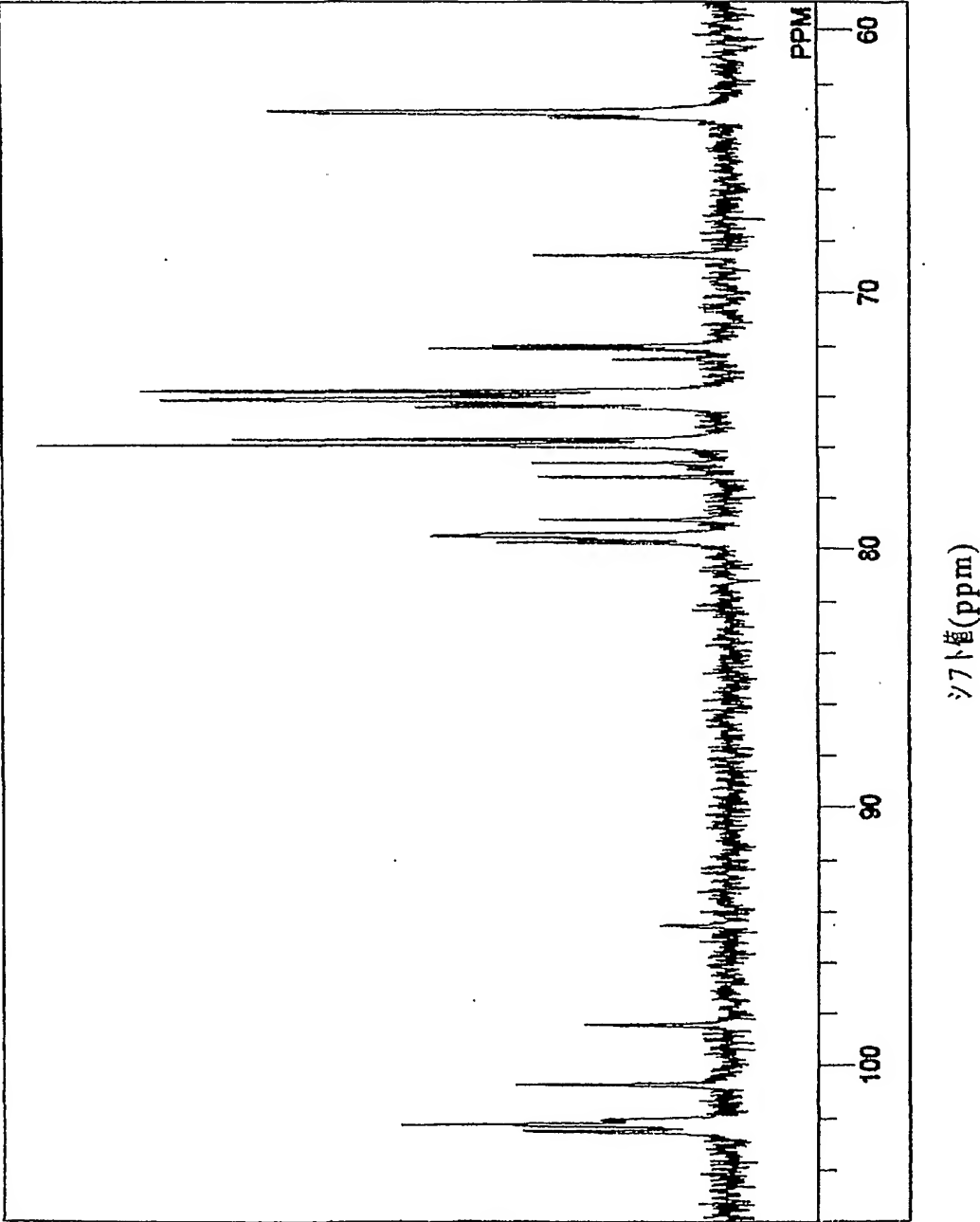
第 4 2 図



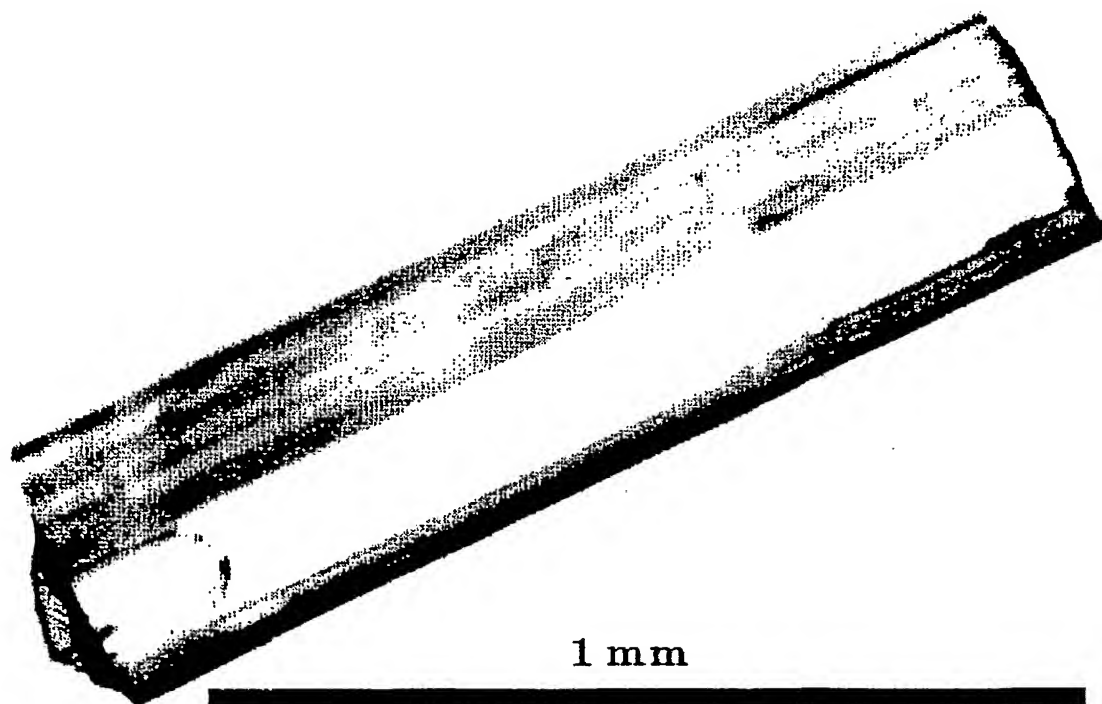
第 4 3 図



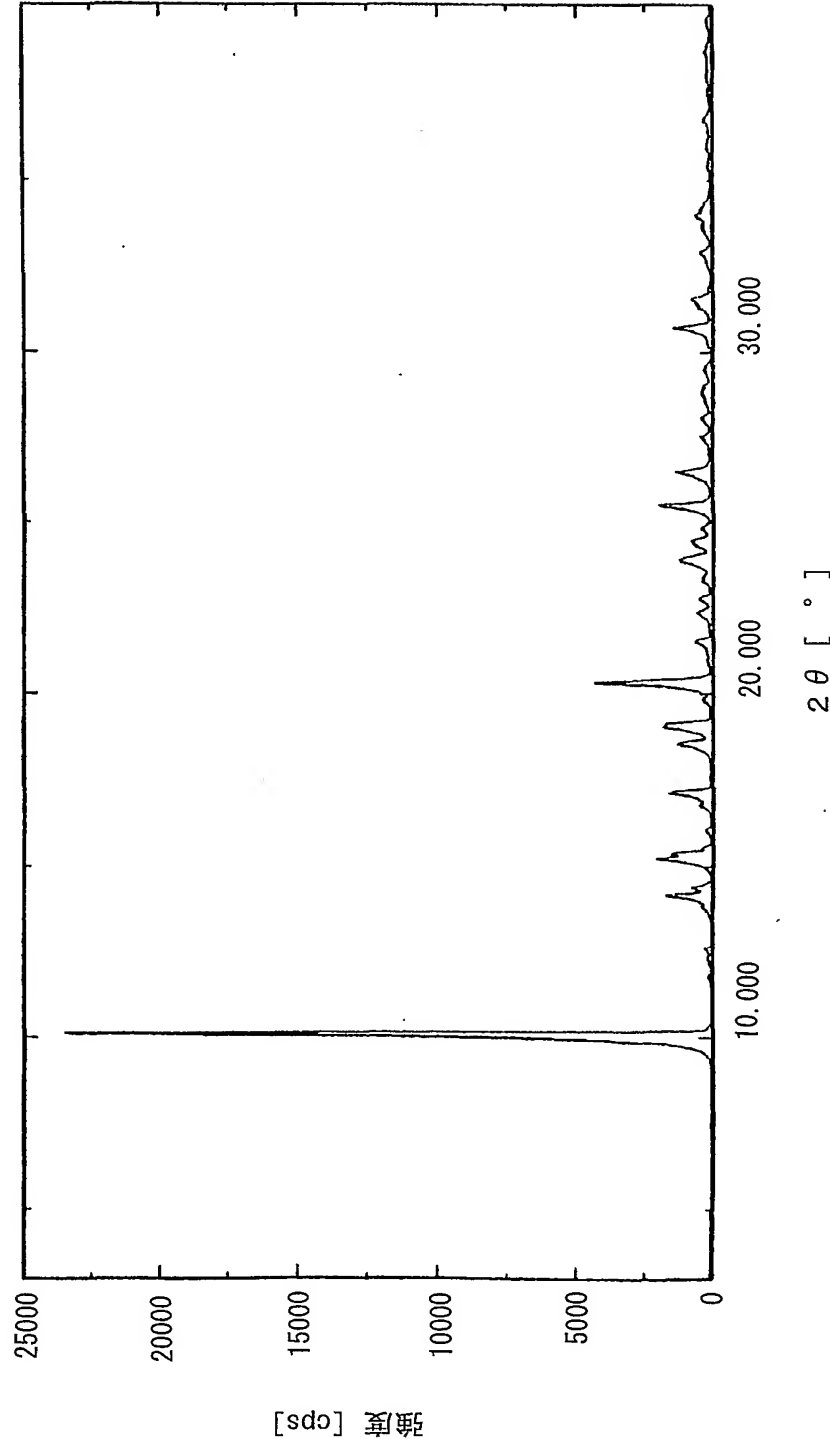
第 4 4 図



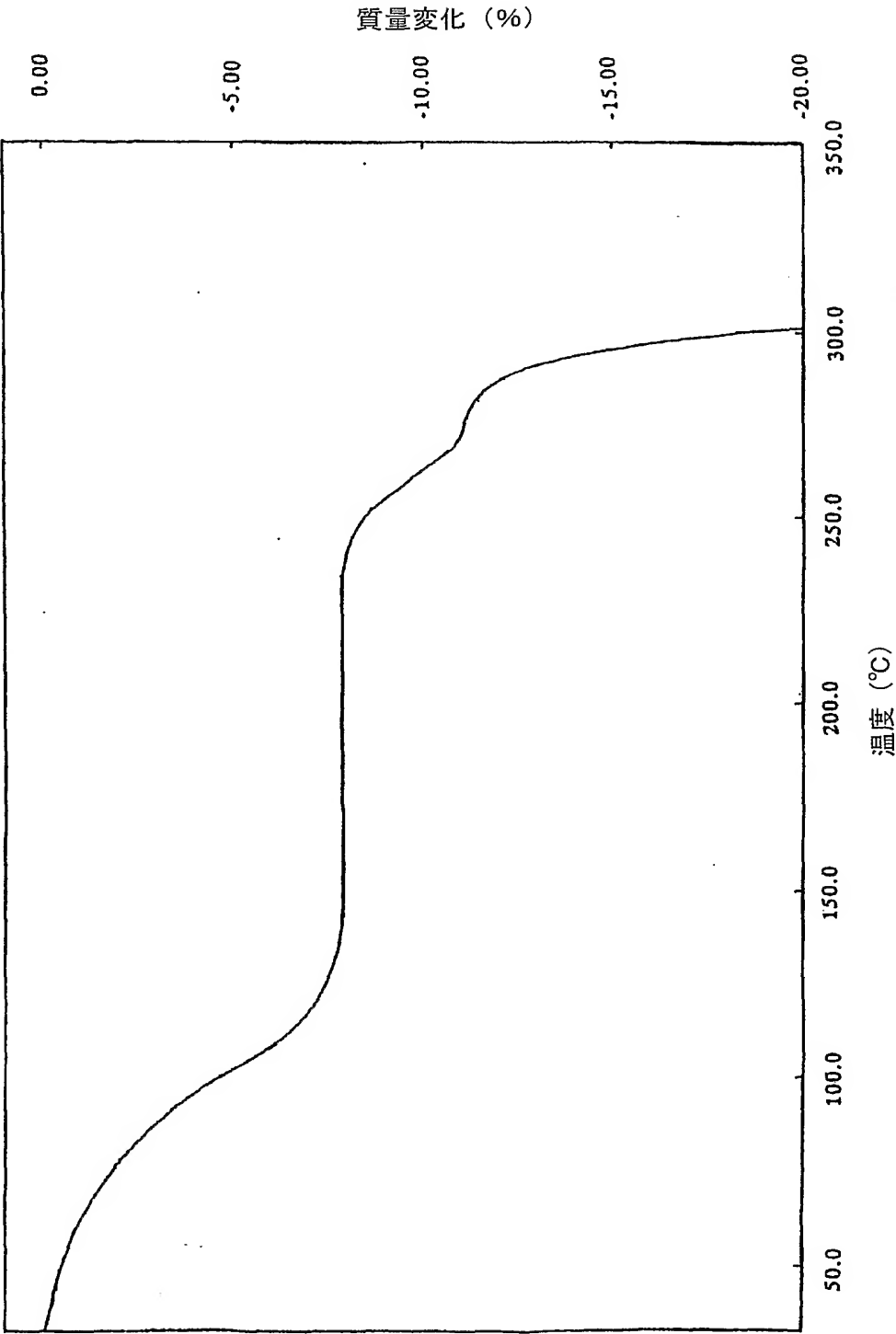
第 4 5 図



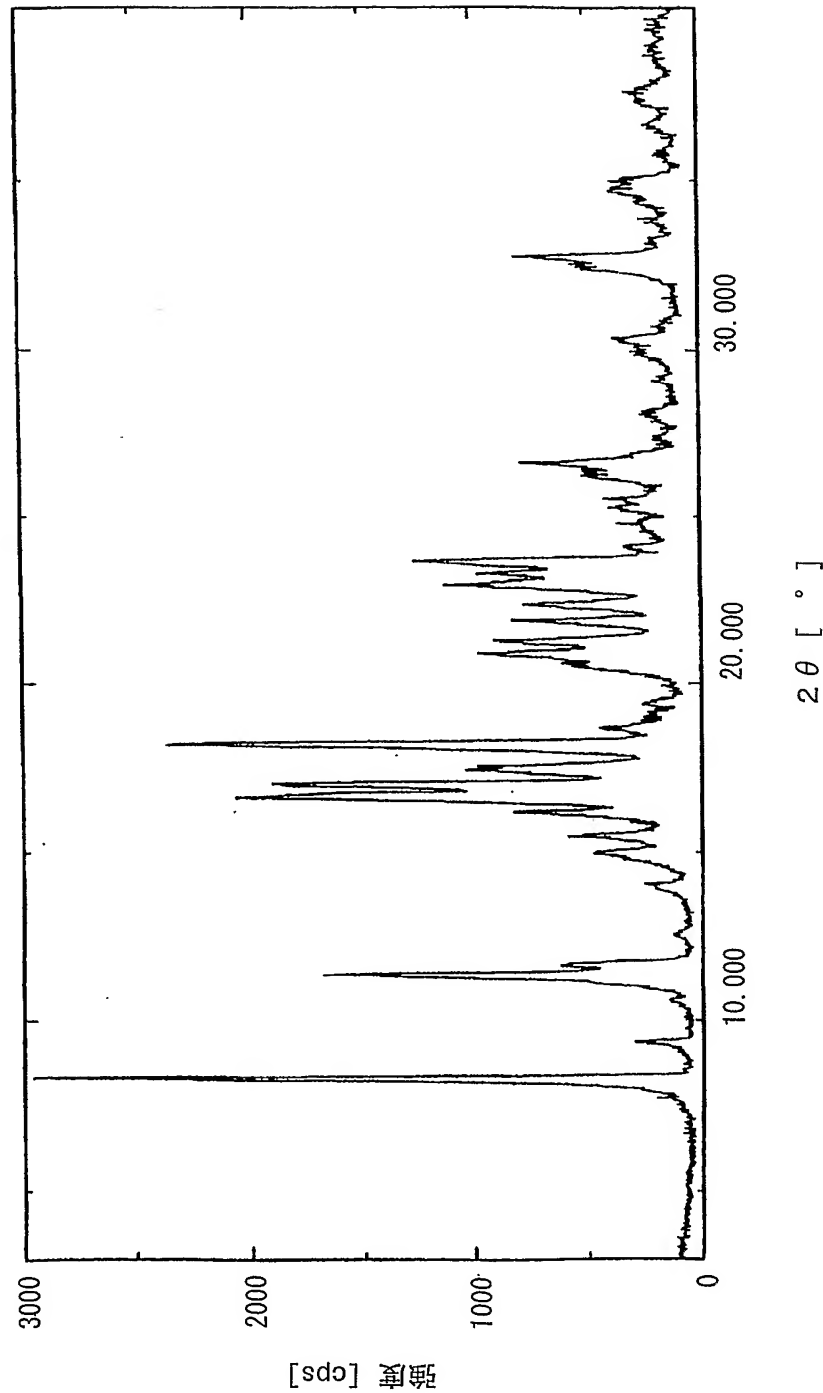
第 4 6 図



第 4 7 図

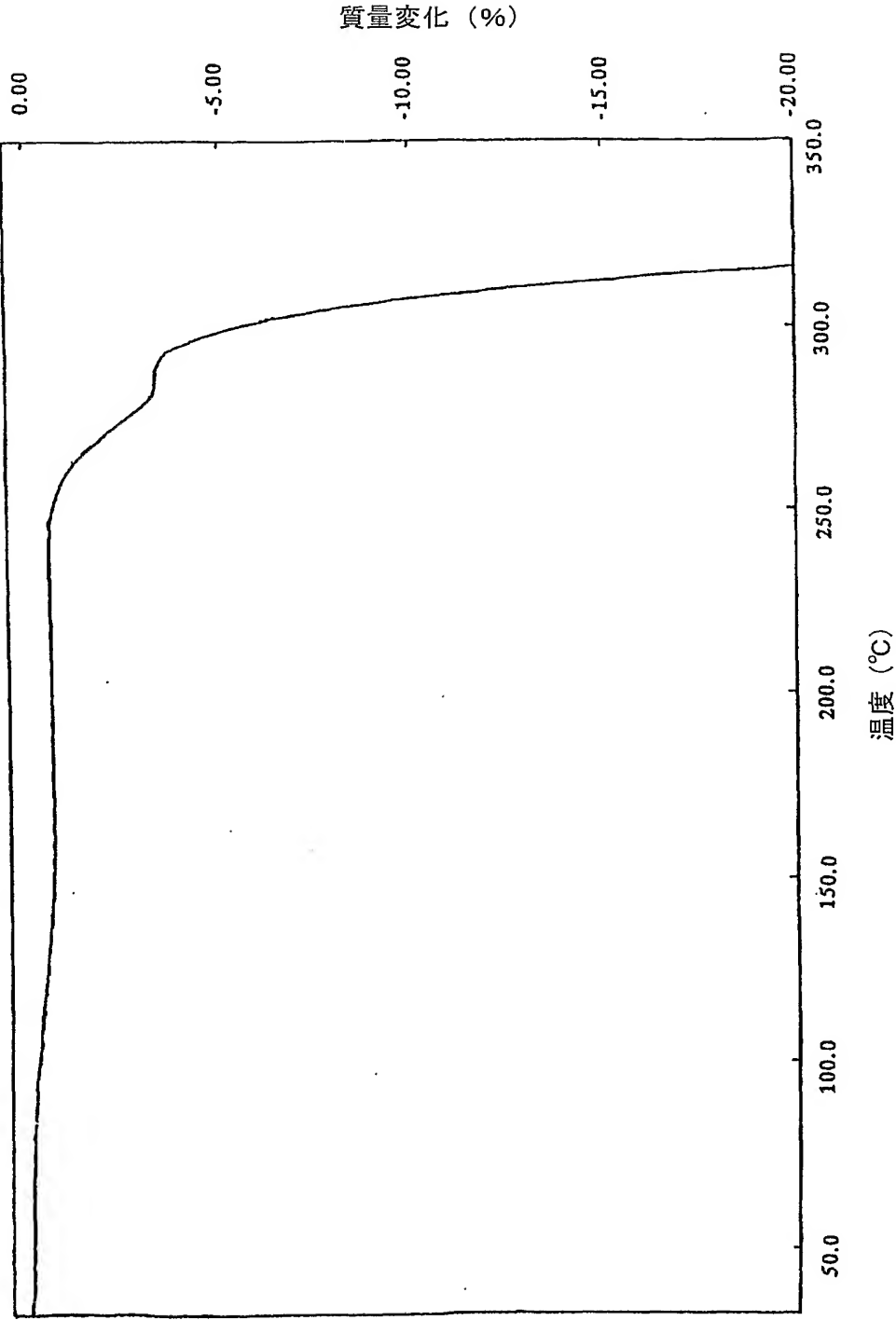


第 4 8 図

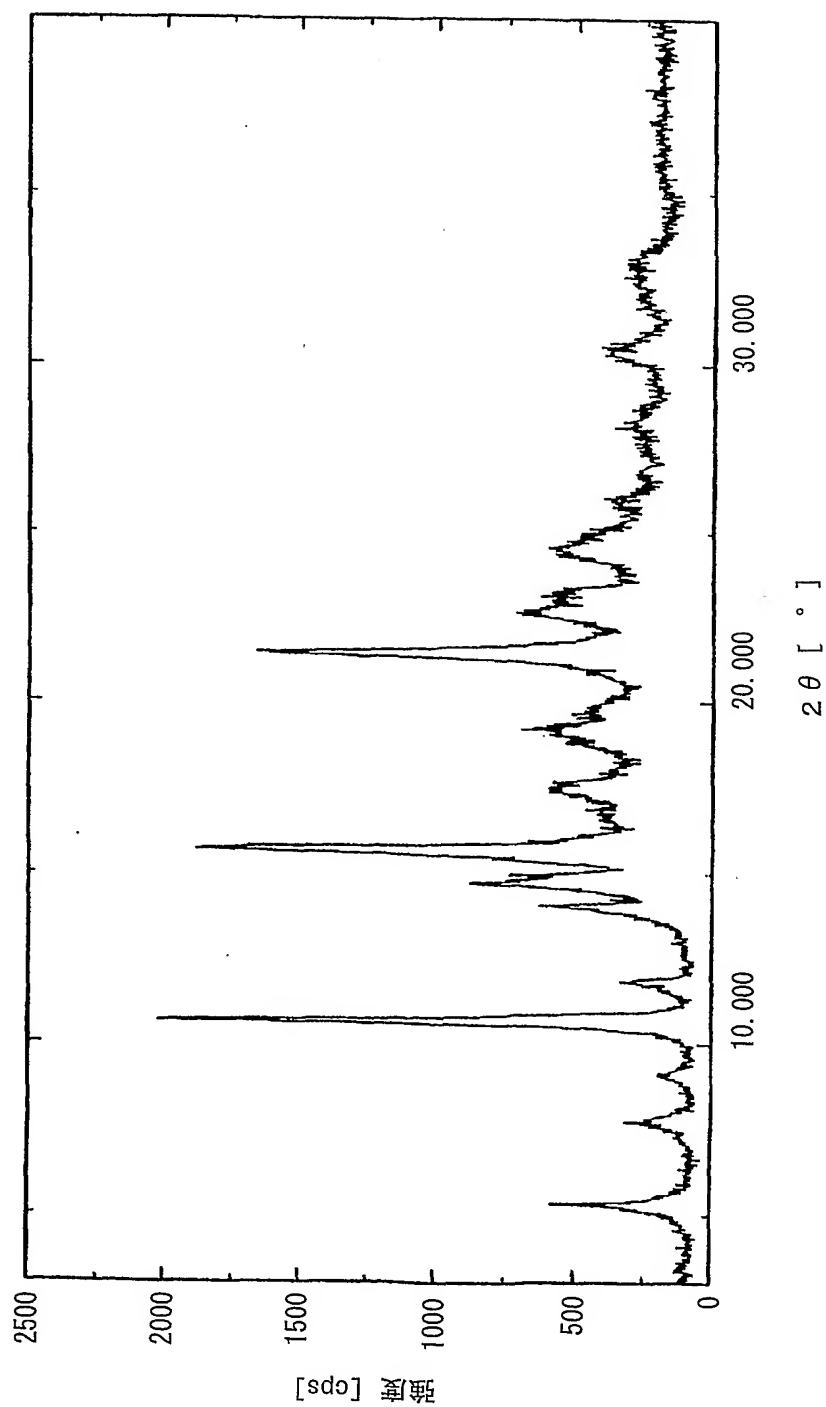




第 4 9 図

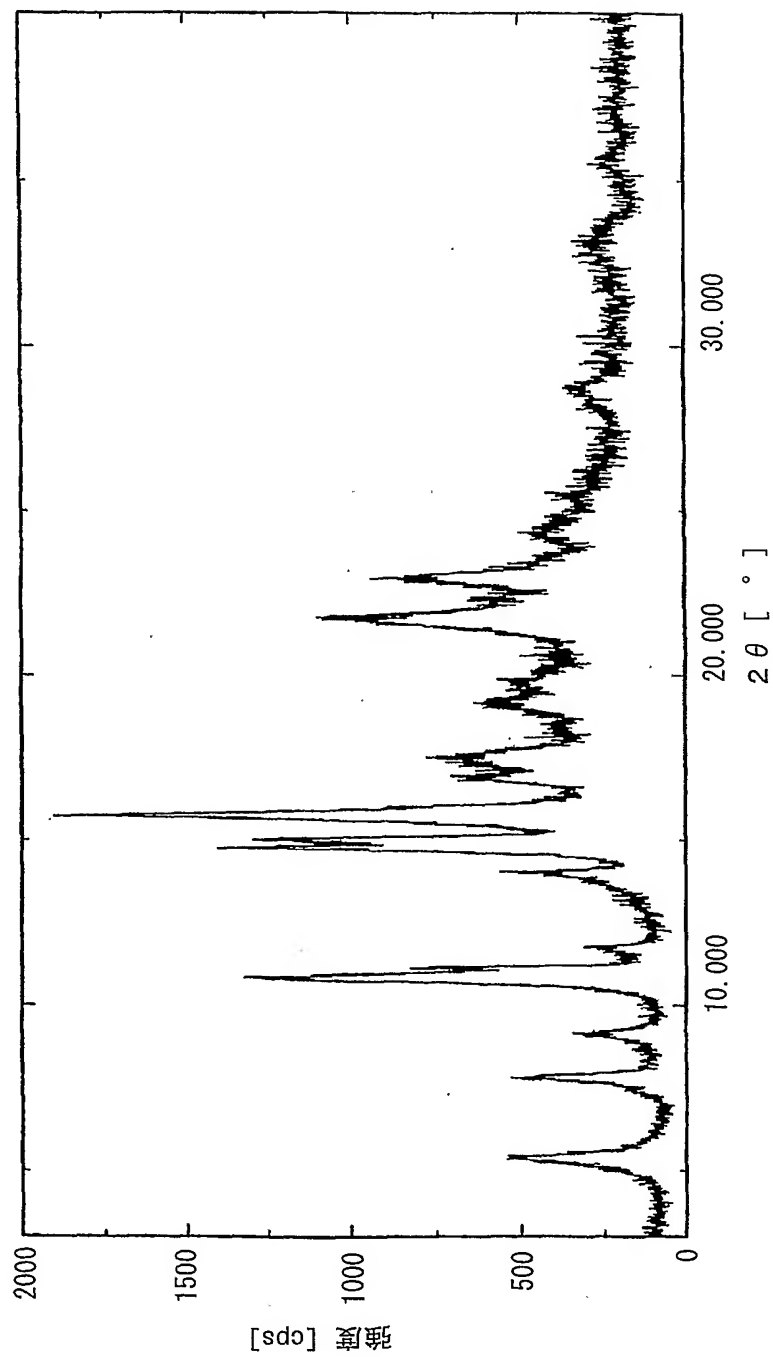


第 5 0 図

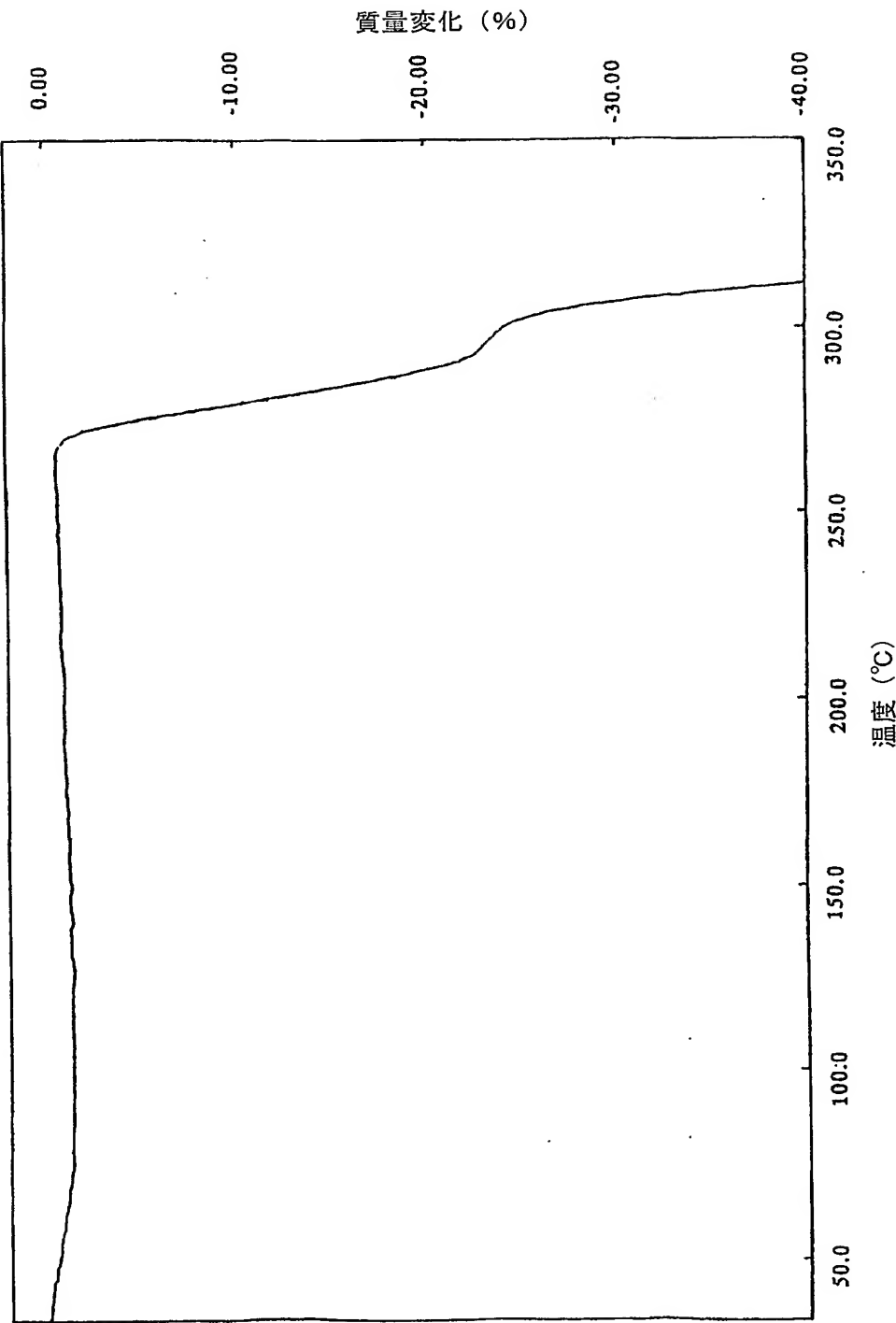


32 / 33

第 5 1 図



第 5 2 図



1 / 6

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120>  $\alpha$ -Isomaltosylgluco-saccharide-forming enzyme, its preparation and  
uses

<130> W0854

<150> 233, 364/00

<151> 2000-8-1

<150> 234, 937/00

<151> 2000-8-2

<160> 19

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 1

Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 2

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Asn Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

2 / 6

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 3

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 4

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 5

Asp Ala Ser Ala Asn Val Thr Thr

1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 6

Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

3 / 6

&lt;400&gt; 7

Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe

1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 8

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr

1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 9

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser

1 5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 10

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser

1 5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

4 / 6

&lt;400&gt; 11

His Val Ser Ala Leu Gly Asn Leu Leu

1 5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 12

Asp Phe Ser Asn Asn Pro Thr Val

1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 13

Tyr Thr Val Asn Ala Pro Ala Ala

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 14

Tyr Glu Ala Glu Ser Ala Glu Leu

1 5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus



5 / 6

&lt;400&gt; 15

Asn Trp Trp Met Ser Lys

1 5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 16

Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp

1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 17

Asn Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp

1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arthrobacter globiformis

&lt;400&gt; 18

Ala Pro Leu Gly Val Gln Arg Ala Gln Phe Gln Ser Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arthrobacter ramosus

&lt;400&gt; 19

6 / 6

Asp	Thr	Leu	Ser	Gly	Val	Phe	His	Gly	Pro
1				5					10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06412

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12P19/00, C07H3/06, A23L1/30, A61K47/26, A61K7/00, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12P19/00, C07H3/06, A23L1/30, A61K47/26, A61K7/00, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5786196 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture), 28 July, 1998 (28.07.98), (Family: none)	16-30,39-42 1-15,31-38
X A	US 5888776 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture), 30 March, 1999 (30.03.99), (Family: none)	16-30,39-42 1-15,31-38
X A	US 5889179 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture), 30 March, 1999 (30.03.99), (Family: none)	16-30,39-42 1-15,31-38
X A	G. L. COTE et al., "Enzymatically produced cyclic $\alpha$ -1,3-linked and $\alpha$ -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose", Eur. J. Biochem., (1994), Vol.226, pages 641 to 648	16-30,39-42 1-15,31-38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 October, 2001 (17.10.01)	Date of mailing of the international search report 30 October, 2001 (30.10.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06412

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Y-K. KIM et al., "Enzymatic Preparation of Novel Non-reducing Oligosaccharides Having an Isomaltosyl Residue by Using the Transfer Action of Isomaltodextranase from <i>Arthrobacter globiformis</i> T6", Biosci. Biotech. Biochem., (1995), Vol.59, No.7, pages 1367 to 1369	1-42
A	H. A. WYCKOFF et al., "Isolation and Characterization of Microorganisms with Alternan Hydrolytic Activity", Current Microbiology, (1996), Vol.32, pages 343 to 348	1-42

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12P19/00, C07H3/06, A23L1/30, A61K47/26, A61K7/00, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12P19/00, C07H3/06, A23L1/30, A61K47/26, A61K7/00, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	US 5786196 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 28. 7月. 1998 (28. 07. 98) (ファミリーなし)	16-30, 39-42 1-15, 31-38
<u>X</u> A	US 5888776 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 30. 3月. 1999 (30. 03. 99) (ファミリーなし)	16-30, 39-42 1-15, 31-38

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 01

国際調査報告の発送日

30.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	US 5889179 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 30. 3月. 1999 (30. 03. 99) (ファミリーなし)	16-30, 39-42 1-15, 31-38
<u>X</u> A	G.L.COTE <i>et al.</i> , Enzymatically produced cyclic $\alpha$ -1,3- linked and $\alpha$ -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose, Eur. J. Biochem. (1994), Vol. 226, p. 641-648	16-30, 39-42 1-15, 31-38
A	Y-K.KIM <i>et al.</i> , Enzymatic Preparation of Novel Non- reducing Oligosaccharides Having an Isomaltosyl Residue by Using the Transfer Action of Isomaltodextranase from <i>Arthrobacter globiformis</i> T6, Biosci. Biotech. Biochem. (1995), Vol. 59, No. 7, p. 1367-1369	1-42
A	H.A.WYCKOFF <i>et al.</i> , Isolation and Characterization of Microorganisms with Alternan Hydrolytic Activity, Current Microbiology (1996), Vol. 32, p. 343-348	1-42